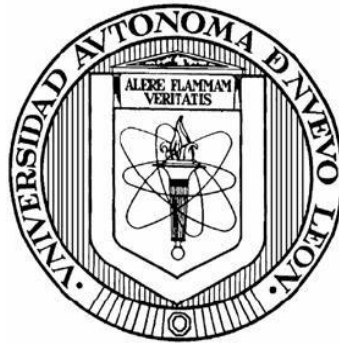


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA Y FACULTAD DE AGRONOMIA



DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETERMINAR EL LINAJE DE LINFOCITOS B
O T PRESENTES EN LINFOMA Y SU POSIBLE DIFERENCIACIÓN CON UNA
ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

Por

MARTHA CATALINA CANTÚ SILVA

Como requisito parcial para obtener el Grado
MC CIENCIA ANIMAL

Octubre 2021

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO FACULTAD DE MEDICINA VETERINA Y ZOOTECNIA Y
FACULTAD DE AGRONOMIA



DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETERMINAR EL LINAJE DE LINFOCITOS B
O T PRESENTES EN LINFOMA Y SU POSIBLE DIFERENCIACIÓN CON UNA
ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

Aprobación de tesis por el comité particular de

Martha Catalina Cantú Silva

Comité de Tesis

Dr. Marco Antonio Cantú Martínez
Presidente

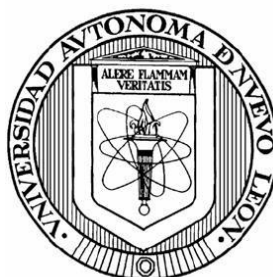
Dra. Diana Elisa Zamora Avila
Secretario

Dra. Magda Celina Navarro Soto
Vocal

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Vocal

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

POSGRADO CONJUNTO FACULTAD DE MEDICINA VETERINA Y
ZOOTECNIA Y FACULTAD DE AGRONOMIA



DIAGNÓSTICO MOLECULAR PARA DETERMINAR EL LINAJE DE
LINFOCITOS B O T PRESENTES EN LINFOMA Y SU POSIBLE
DIFERENCIACIÓN CON UNA ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

Aprobación de tesis por el comité
particular de Martha Catalina Cantú Silva

Comité de Tesis

Dr. Marco Antonio Cantú Martínez
Director de Tesis

Dra. Diana Elisa Zamora Avila
Co-Director

Dra. Magda Celina Navarro Soto
Co-Director

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Co-Director Externo

DEDICATORIA

A Dios, mis padres y mis perritos.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) que permitió con su apoyo la realización de este proyecto.

Al Posgrado en conjunto de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y la Facultad de Agronomía por la oportunidad de pertenecer a su plan académico y por la aceptación de mi proyecto de investigación.

Al Dr. Marco Antonio Cantú Martínez Profesor Investigador del departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL por haber creído en mí para la realización de este proyecto, por la paciencia que tuvo conmigo durante todo este tiempo, por su dedicación a cada uno de mis avances, a su paciencia para resolver cada una de mis dudas, por el empeño y dedicación que puso siempre en este proyecto, por el apoyo de facilitarme siempre cada uno de los materiales que necesité, por ser uno de mis más grandes ejemplos de dedicación, paciencia y perseverancia.

A la Dra. Diana Elisa Zamora Avila, Profesora Investigadora del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Por su apoyo, y su amabilidad para resolver mis dudas, por recordarme que no todo siempre es sencillo, pero nada resulta imposible y por el apoyo a culminar este proyecto.

A la Dra. Magda Celina Navarro Soto Profesora Investigadora del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL. Por su apoyo, por crear confianza en mí misma y hacerme ser observadora que con dedicación y mucho esfuerzo todo tiene siempre una buena recompensa.

Al Dr. Moisés Armides Franco Molina Profesor Investigador del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Por su apoyo y confianza incondicional para la realización y culminación de este proyecto.

A Dios por darme la fuerza cuando sentía que estaba cansada, por guiarme cada uno de mis días, por ser luz en mi oscuridad, y por amarme tanto. Por darme la oportunidad de siempre sentirlo a mi lado.

A mi madre por ser la mujer más maravillosa que he podido conocer en este mundo material, por ser mi apoyo incondicional, por abrazarme cuando me he sentido derrotada, por alentarme y ayudarme a descubrir que nada es imposible, por amarme aún y cuando me he equivocado, por ser la luz más bonita que han visto mis ojos, por permitirme admirarla por lo extraordinaria que ella es.

A mi padre por creer en mí, aún y cuando no tengo experiencia en las cosas en las que él es experto, por dejarme abrirme mi propio camino con caídas, pero el estando siempre ahí para dejarme apoyar en él y levantarme. Por ser mi maestro de vida y a la vez ser mi maestro y guía de formación académica. Por cada palabra que me dice para hacer mejor las cosas, por hacerme creer en mí misma.

A mis perritos kelly y pinky, que se desvelaban conmigo mientras hacia las presentaciones para mis seminarios, y que en varias ocasiones llegaron a acompañarme a la facultad y esperaban pacientemente a que terminara mis experimentos. Mi pinky, aunque ahora te encuentres en el cielo, te siento presente en muchas ocasiones, y sé que sigues haciéndome compañía en los días más complicados y en los días más divertidos. Aún te veo junto a kelly acompañándome en mis desvelos y disfrutando de cada una de nuestras aventuras.

A mis compañeros que hicieron esta aventura aún más divertida y memorable. Especialmente a un gran amigo que me regalo parte de su tiempo y conocimientos para no perderme de esta aventura, se encuentra en el cielo, pero me regalo el poder apreciar cada momento en este mundo material.

A cada una de las personas que me acompañaron en este camino, a quienes ya no están quizás de forma física, pero espiritualmente me siguen acompañando en cada uno de mis días. Con todo el corazón agradezco poder finalizar este trabajo llena de amor, salud, familia, y con muchas ganas de seguir avanzando y creciendo en todas las formas posibles.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	i
Agradecimientos.....	ii
Índice.....	iv
Índice de Tablas.....	vi
Índice de Figuras.....	vii
Lista de abreviatura y Símbolos.....	viii
Resumen.....	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
Literatura Revisada.....	4
Clasificación de las neoplasias	4
Linfoma Canino	4
Etiología	6
Factores de riesgo.....	7
Factores de edad.....	7
Factores raciales.....	7
Factores Genéticos.....	7
Factores Infecciosos.....	8
Factores Ambientales.....	8
Factores Inmunológicos.....	9
Presentación del linfoma canino de acuerdo con su clasificación anatómica.....	11
Clasificación por Inmunofenotipo.....	13
Diagnóstico clínico de linfoma canino.....	15
Examen Físico.....	15
Pruebas de laboratorio.....	16
Histología y citología.....	16
Generalidades de linfoma en humanos.....	17
Los linfocitos.....	18
Clasificación de los linfocitos.....	18
Estructura de los linfocitos.....	19
Mecanismos de generación de la gran diversidad de linfocitos B y linfocitos T.....	19
Linfocitos T.....	21
Linfocitos B.....	22
Técnicas de diagnóstico molecular.....	25
Determinación del inmunofenotipo en el linfoma.....	25
Clonalidad en el linfoma canino.....	26

Justificación.....	28
Hipótesis.....	29
Objetivo General.....	30
Objetivos Específicos.....	30
Materiales y métodos.....	31
Muestras.....	31
Procesamiento de las muestras.....	31
Muestras de tejidos incluidas en bloques de parafina.....	32
Muestras de tejido incluidos en formalina.....	32
Muestras sanguíneas.....	33
Extracción de DNA a partir de muestras incluidas en cubos de parafina y tejidos incluidos en formalina.....	33
Extracción de DNA a partir de muestras sanguíneas.....	36
Cuantificación de ácidos nucleicos.....	37
Detección de regiones específicas en linfoma canino mediante PCR punto final.....	38
Primers.....	38
Preparación de tubos PCR punto final.....	40
Condiciones del termociclador para PCR punto final.....	41
Resultados.....	43
Muestras incluidas en cubos de parafina.....	44
Muestras en formalina.....	46
Muestras Sanguíneas.....	49
Discusión.....	52
Conclusiones.....	57
Bibliografía.....	58
Anexo 1.....	72
Anexo 2.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Características clínicas presentes en los pacientes caninos al desarrollar linfoma de acuerdo con su clasificación anatómica y su frecuencia relativa.....	10
Tabla 2.	Clasificación Ann Arbor de linfoma determinando el grado de propagación en los pacientes.....	17
Tabla 3.-	Primer utilizados en la estandarización de la técnica y su región específica en TCR y BCR.....	40
Tabla 4.-	Cantidades que se utilizaron en la Técnica de PCR para la estandarización en las diferentes muestras.....	41
Tabla 5.-	Total, de muestras y el tipo de muestras utilizando los diferentes tipos de Primer.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Esquema de la gran variedad de genes puede codificar cada una de las regiones (Variable (V), Diversa (D), Unión (J), y Constante (C)).	20
Figura 2.- Esquema del complejo TCR de los linfocitos T.....	21
Figura 3.- Estructura del receptor de linfocitos T y su complejo TCR	22
Figura 4.- Receptor de la Célula linfocítica B y su receptor BCR.....	23
Figura 5.- Estructura del receptor BCR de linfocitos B.....	24
Figura 6.- Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando el Juego de primers 1 & 4 y juego de primers 3 & 2.....	44
Figura 7.- Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando Juego de primers 5 & 6 y juego de primers 7 & 8.....	45
Figura 8.- Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando Juego de primers 9 & 10.....	46
Figura 9.- Muestras en formalina utilizando Juego de primers 1 & 4, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.....	47
Figura 10. Muestras en formalina utilizando Juego de primers 9 & 10, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.....	48
Figura 11.- Muestras en formalina utilizando juego de primers 9 & 10, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.....	49
Figura 12.- Muestras sanguíneas con juego de primers 1 & 4 y 3 & 2.....	49
Figura 13.- Muestras de sangre con juego de primers 5 & 6 y 7 & 8.....	50
Figura 14. Muestras sanguíneas con juego de primers 9 & 10.....	50

LISTA DE ABREVIATURA Y SIMBOLOS

- ADN: Ácido Desoxirribonucleico
- Bcl-2: Proteína que permite el control de apoptosis de una célula mediante su destrucción o su supervivencia.
- P53: Gen supresor de tumores. Este gen permite dar origen a una proteína que se localiza en el núcleo de las células, la cual tiene gran importancia en el proceso de división celular y apoptosis.
- P16: Proteína supresora de tumores. Esta proteína tiene gran importancia en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones que pueda sufrir esta proteína pueden provocar el desarrollo de diversas neoplasias.
- N-ras: Gen que permite dar origen a una proteína que tiene un papel importante en la regulación de la división celular. El papel que juega fundamentalmente esta proteína es la transducción de señales, y lo hace desde el exterior al núcleo de la célula para permitir su crecimiento, división, proliferación, maduración y diferenciación. El gen ras se conoce también por su papel como oncogén, estas células cuentan con el potencial de poder hacer que las células normales adquieran el papel de células cancerosas.
- NF-kB: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras *kappa* de las células B activadas. Se puede considerar al NF-kB como un complejo proteico que desarrolla un papel importante en la transcripción de ADN, y también en la regulación de la respuesta inmune, por lo que si se presenta una mala regulación puede desarrollarse el cáncer entre otras enfermedades.
- TRAF3: Receptor TNF que se encuentra asociado con el factor 3, esta molécula tiene participación en la señalización de diversos miembros de la superfamilia de receptores de TNF.
- MAP3k14: Gen codificador de proteínas.
- FBXW7: Gen codificador de proteínas, siendo miembro principal de una familia de proteínas F-box. Las mutaciones que pueda sufrir este gen se detectan principalmente en el desarrollo de cáncer, y se han encontrado diversas isoformas para este gen.

- POT1: Gen codificador de proteínas. Codifica principalmente una proteína nuclear en que participa en la regulación de la longitud de los telómeros y el mantenimiento de los telómeros. Puede causar alteraciones en el proceso de carcinogénesis si este gen se encuentra en sobreexpresión transcripcional.
- 2,4-D: Ácido 2,4-dicloronfenoxiacético. Es un herbicida que en la actualidad se puede encontrar con diversas formulaciones y distintos nombres comerciales.
- CD4: Se pueden encontrar también con el nombre de linfocitos T4, son células que pertenecen a la línea blanca y tienen un papel importante y fundamental para combatir problemas infecciosos y otorgar respuestas a través del sistema inmunitario.
- CD8: Célula linfocítica que permite el reconocimiento y destrucción de células que han sido infectadas por diversos microorganismos. Estas células se expresan principalmente en la superficie de algunas células T, que son conocidas también como citotóxicas. Se considera una glucoproteína dimérica que participa en la adhesión del receptor de linfocitos T a las moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I.
- CD79: Proteína transmembranal que en conjunto con el receptor de linfocito B permite la generación de una señal posterior a que se reconozca el antígeno. Esta molécula se compone principalmente de dos cadenas que son conocidas como CD79a y CD79b y esta célula se suele expresar solamente en las células B y neoplasias de células B.
- CD20: Proteína que se encuentra solamente en el linaje de las células B. Al encontrarse en grandes porcentajes se puede asociar a que los pacientes están desarrollando alguna enfermedad, que principalmente pueden corresponder a linfomas de células B o leucemias.
- CD3: Se denomina así a un complejo de proteínas de membrana que tiene como función principal la transducción de señales al interior de las células.
- SNC: Sistema nervioso central.
- LNH: Linfoma no Hodgkin.
- DLBCL: Linfoma difuso de células B.
- PTCL: Linfoma periférico de células T no específico.

- TZL: Linfoma de la zona T.
- M2L: Linfoma de zona marginal.
- WF: Working Formulation. Esta formulación permite la clasificación de los linfomas no Hodgkin para poder permitir un mayor conocimiento en el ámbito médico sobre esta neoplasia.
- BCR: Receptor de antígeno de células B. A través de este receptor es que las células B pueden integrar toda la información recibida en conjunto con correceptores y receptores de coestimuladores e inhibidores para producir diversas respuestas celulares.
- TCR: Receptor de antígeno de células T. Las células T tienen la capacidad de cumplir la función de reconocimiento antigénico a través de su receptor de membrana TCR. Los antígenos pueden provenir de manera externa o interna y son procesados por las células presentadoras de antígenos. Estos determinantes antigénicos pueden ser procesados al ser expuestos en la superficie de una célula presentadora de antígenos unidos a una molécula del Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- kDa: Kilodalton. Se utiliza principalmente para poder referirse a masas moleculares orgánicas muy grandes.
- CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- CDR: Región determinante de la complementariedad.

Resumen

El linfoma o también llamado linfosarcoma es una de las principales neoplasias malignas que se presentan en la especie canina. Su origen se da principalmente en los tejidos linfoides, sin embargo, también puede tener un origen multifactorial debido a que puede originarse a partir de algún tejido no linfoide. El linfoma se encuentra conformado por linfocitos T o linfocitos B. Se han reconocido cinco presentaciones anatómicas del linfosarcoma: Digestiva, Cutánea, Mediastínica, Extranodular y Multicéntrica, siendo esta última la presentación con mayor porcentaje en los caninos. La técnica de Reacción en Cadena Polimerasa (PCR) permite evaluar la clonalidad e identificar el linaje que predomina en el linfoma, teniendo como principales ventajas el uso de pequeñas cantidades de ADN, así como también permite la utilización de material parafinado. Este proyecto tuvo como finalidad la estandarización de la técnica PCR en punto final para detectar y determinar la presencia mayoritaria de células B o células T presentes en una muestra de tejido (linfoma) y posteriormente con ello poder diferenciarla de una enfermedad linfoproliferativa de un linfoma, la técnica se estandarizó con muestras de tejido parafinado y posteriormente fue probada con muestras de tejido en formalina y muestras sanguíneas de pacientes que eran sospechosos de estar desarrollando esta neoplasia de acuerdo con la sintomatología y el historial clínico, se utilizaron diversos juegos de primers que permitieron su identificación y su clasificación para determinar si era un linfoma de células T o de células B, para las muestras de tejido incluidas en cubos de parafina se obtuvieron un total de 20 muestras de las cuales cinco de ellas resultaron positivas a un linfoma de células T y 15 para linfoma de células B, para las muestras de tejido incluidas en formalina se obtuvo un total de 16 muestras donde ocho de ellas resultaron ser positivas para un linfoma de células T y las ocho restantes para un linfoma de células B, mientras que en las muestras sanguíneas se obtuvo un total de 21 muestras de las cuales 16 resultaron positivas para un linfoma de células T, por otro lado, las cinco muestras restantes resultaron negativas a cualquier juego de primers que se utilizó.

Como conclusión, en el linfoma canino existe una gran diversidad de recombinaciones somáticas que ocurren completamente al azar, y la técnica molecular PCR punto final se puede utilizar como un método complementario en el diagnóstico para la detección de esta neoplasia.

Abstract

Lymphoma or also called lymphosarcoma is one of the main malignancies that occur in the canine species. Its origin occurs mainly in lymphoid tissues, however it can also have a multifactorial origin because it can originate from some non-lymphoid tissue. The lymphoma is made up of T lymphocytes or B lymphocytes. Five anatomical presentations of lymphosarcoma have been recognized: Digestive, Cutaneous, Mediastinal, Extranodular and Multicentric, the latter being the presentation with the highest percentage in canines. The polymerase chain reaction (PCR) technique makes it possible to evaluate the clonality and identify the lineage that predominates in the lymphoma, having as main advantages the use of small amounts of DNA, as well as allowing the use of paraffinized material. The purpose of this Project was to standardize the endpoint PCR technique to detect and determine the majority presence of B cells or T cells present in a tissue sample (lymphoma) and subsequently to be able to differentiate it from a lymphoproliferative disease of a lymphoma, the technique was standardized with paraffin tissue samples and later it was tested with tissue samples in formalin and blood samples from patients suspected of developing this neoplasm according to the symptoms and clinical history, various sets of primers were used that allowed its identification and its classification to determine if it was a T-cell or B-cell lymphoma, for tissues samples included in paraffin cubes, a total of 20 samples were obtained, five of them were positive for a T-cell lymphoma and 15 for B-cell lymphoma, for formaline-embedded tissue samples it was obtained a total of 16 samples where eight of them were positive for T-cell lymphoma and the remaining eight for a B-cell lymphoma, while in the blood samples a total of 21 samples were obtained, of with 16 were positive for a T-cell lymphoma, on the other gans, the ramaining five samples were negative for whatever primer set was used.

In conclusion, in canine lymphoma there is a great diversity of somatic recombinations that occur completely randomly, and the molecular endpoint PCR technique can be used as a complementary diagnostic method for the detection of this neoplasm.

Introducción

El cáncer ha sido considerado como una de las principales causas de muerte en animales de compañía. Se ha descrito como una anomalía que tiene una diversa forma de apariencias y presentaciones (Adams VJ et al. 2010). El cáncer puede relacionarse con otras palabras conocidas como tumor o neoplasia, sin embargo, se pueden dar diferentes contextos a cada una de ellas, por ejemplo, cuando hablamos de un tumor podemos referirnos a una hinchazón o inflamación macroscópica, y es un término genérico que tiende a utilizarse para dar una descripción a alguna masa encontrada en los pacientes, mientras que el término de neoplasia puede describirse mejor como un nuevo crecimiento que será dado a un proceso patológico. Por lo que se puede comprender que el cáncer abarca los dos términos anteriores, y comparten la característica de ser una enfermedad que tiene un crecimiento de células anormales de una manera incontrolada en el huésped. En la actualidad se mantiene aún considerado que la mayoría de los procesos neoplásicos pueden ser originados a partir de un único precursor o de una misma célula madre (James M. & Duncan X, 2014.).

Las células cancerígenas pasan por una constante mutación en ellas, por lo que comienzan a adquirir diferentes habilidades tales como lograr el ser invasivas o incluso poder causar una metástasis en el huésped. Se ha considerado que las células cancerígenas adquieren algunas de estas aptitudes dentro de sus mutaciones: ser autosuficientes en sus señales de crecimiento, evasión de los procesos de apoptosis, que son necesarios para evitar el crecimiento descontrolado de las células, angiogénesis sostenida y por consiguiente la invasión hacia los tejidos y su posible desarrollo de un problema metastásico (James M. & Duncan X, 2014.).

El cáncer no puede considerarse como una enfermedad única, debido a que puede presentarse y desarrollarse de maneras muy diferentes, por lo que este término puede describir una amplia gama de enfermedades que tienen una característica en común que son la proliferación y el crecimiento celular de una manera descontrolada. El cáncer según mencionan algunos autores se considera una enfermedad genética (Villamil JA et al. 2009).

El cáncer generalmente es un término que puede abarcar una amplia variedad de condiciones, y puede describirse el desarrollo tumoral mediante cinco posibles etapas, en la cual la primera se presenta una célula que se encuentra alterada genéticamente dentro de la población normal, sin embargo, esta misma célula lograra tener la tendencia de seguir proliferando cuando en un estado de normalidad debería de encontrarse en reposo. La segunda etapa se reconoce como hiperplasia, en esta la célula que se encuentra alterada genéticamente adquiere la capacidad de proliferar, sin embargo, en una de estas proliferaciones presentes una de sus progenies sufrirá una mutación y será entonces cuando se comience a tener presente un crecimiento nuevo de manera descontrolada. La tercera etapa es conocida como displasia, en esta etapa esta progenie se presenta como célula normal en cuanto apariencia y comportamiento, sin embargo, al pasar del tiempo adquiere la capacidad de sufrir una mutación y es aquí donde se comienza a tener una alteración en el comportamiento celular. La cuarta etapa se conoce como cáncer *in situ*, en esta etapa la progenie de la célula que ya presentó mutaciones comienza a presentar mayores alteraciones en su estructura y se comienzan a detonar características consideradas malignas, en este estado a pesar de presentar un mal aspecto, el tumor gracias a la contención que se tiene dada por la membrana basal, aún no logra ser invasivo para las demás células o para el huésped. Por último, en la quinta etapa es cuando el cáncer ya se considera invasivo, esto dado principalmente por la acumulación de las mutaciones de las células presentes, estas células posiblemente han presentado la pérdida de algunos factores de cohesión, además pueden verse afectados los vasos sanguíneos, así como también los linfáticos, pudiendo tener una metástasis (James M. & Duncan X, 2014.).

Literatura revisada

Clasificación de las neoplasias

Las neoplasias pueden diferenciarse en dos categorías de acuerdo con la presentación y desarrollo que tengan, puede ser neoplasias benignas o neoplasias malignas. Generalmente las neoplasias que se consideran benignas tienen un comportamiento celular similar al de las células que se encuentran en reposo, al igual que pueden tener su morfología sin cambios tan marcados, sin embargo, tienen la característica de proliferar de una manera más rápida que las normales, mientras que las neoplasias malignas presentan cambios en su morfología y un crecimiento acelerado e incontrolado. Por otro lado, las neoplasias benignas cuentan en su morfología con una cápsula fibrosa que permite una separación de los tejidos normales y gracias a esto se evita el proceso metastásico que por otro lado si se desarrollan en las neoplasias malignas (Zachary J.F & McGavin M.D, 2013).

Dentro de las neoplasias caninas el linfoma abarca alrededor de un 26% en comparación con otras como osteosarcoma con un 6%, hemangiosarcoma con 22%, tumores de glándula mamaria con un 18%, tumores glandulares que afectan a tiroides, adrenales y páncreas con un 18%, tumores de sistema nervioso central con un 6%, y pulmón con un 12% (James M. & Duncan X, 2014.).

Linfoma Canino

El linfoma canino o también conocido como linfosarcoma se define como aquel grupo de neoplasias heterogéneas que tienen en común un grupo de células de origen linforeticular conformadas por células linfocíticas, estas células pueden pertenecer a dos diferentes tipos de linaje, linfocitos B o linfocitos T. Este tipo de neoplasias se originan en tejidos linfoides como son los ganglios linfáticos, sin embargo, pueden surgir a partir de tejidos no linfoides como lo son bazo, hígado y médula ósea, se han reportado estudios donde se menciona que la mayoría de los casos que se han presentado es la forma extranodal y son a partir de las células T.

Esta neoplasia se considera una de las principales que se desarrollan en la especie canina, y comprende aproximadamente del 7% al 26% de todas las neoplasias caninas y un 80%

de las neoplasias hematopoyéticas. El linfoma canino se ha relacionado estrechamente con el linfoma no Hodgkin (LNH) en humanos de acuerdo con sus similitudes al desarrollar la neoplasia, tales como signos clínicos inespecíficos y desarrollo, en el caso de LNH representa alrededor del 6% de todos los casos de cáncer y se considera la quinta causa de muerte y como el segundo cáncer que se presenta con un crecimiento avanzado con una alta mortalidad (Ferreira de la cuesta & Pedraza F, 2003; Modiano JF et al, 2005; Moore A.S, 2007).

Etiología

El linfoma canino se encuentra dentro de los tumores hematopoyéticos, que son aquellos originados a partir de sus precursores de médula ósea, de las células sanguíneas y del sistema linfático. El linfoma o también conocido como linfoma maligno o linfosarcoma, abarca un grupo de diversas neoplasias que tienen un origen a partir de los tejidos linfoides, es una de las principales neoplasias malignas que se presentan en la especie canina (Kaiser H, 1981).

En la actualidad se considera como una neoplasia de origen multifactorial, debido a que puede desarrollarse a partir de tejidos no linfoides como por ejemplo en bazo, y médula ósea. Aproximadamente se encuentra en un rango de aparición del 7% al 24% abarcando todas las neoplasias caninas y alrededor de un 83% de las neoplasias hematopoyéticas (Jemal A, et al. 2004).

El linfoma canino es una neoplasia que contiene un grupo de células de origen linforeticular, sin embargo, se ha comprobado que también su origen es multifactorial, debido a las diversas formas de presentación que se han encontrado en pacientes que han sido diagnosticados con linfoma canino. Se ha sugerido que existen algunos factores que juegan un papel importante para su mayor predisposición de desarrollar esta neoplasia, dentro de los cuales se encuentran la raza, edad, predisposición inmunitaria, exposición a sustancias potencialmente carcinógenas que se encuentran asociados a la contaminación ambiental, la exposición a solventes y herbicidas, así como factores genéticos, sin embargo, no se ha determinado una causa común para el desarrollo de esta neoplasia (Hoojiberg E, et al. 2018).

Factores de riesgo

Diversos factores han sido considerados relevantes para que los caninos tengan una mayor predisposición para desarrollar el linfoma canino, sin embargo, el origen como tal del desarrollo de esta neoplasia no se tiene bien definido.

Factores de edad

En los caninos pueden presentarse diversos factores que se han considerado relevantes para la aparición de linfoma. El promedio de edad de los pacientes que han sido reportados con esta neoplasia abarca de los 6 a 10 años. Sin embargo, no descarta el desarrollo de linfoma en pacientes geriátricos, así como en pacientes con una edad más corta a los seis años (Hoojiberg E, et al. 2018).

Factores raciales

Aunque la posibilidad de que cualquier canino desarrolle linfoma sin pertenecer a una raza en particular es completamente viable, se han encontrado algunas razas que tienen una mayor predisposición que pudiera considerarse como un factor de importancia (Edwards DS et al. 2004). Las razas que se han encontrado con una mayor incidencia incluyen: bóxer, basset hound, rottweilers, bullmastiffs, bulldog, san bernardo, cocker spaniel, Terrier escocés, golden retriever y labrador, como las principales (Poche et al. 2017). Por otro lado, se ha descrito que también existen algunas razas que presentan una menor incidencia para el desarrollo del linfoma canino, dentro de las cuales se encuentran los dachshund y pomerania (Priester WA & McKay FW, 1970).

Factores genéticos

Las aberraciones cromosómicas para el desarrollo de linfoma canino son de gran impacto, la disponibilidad comercial del genoma canino ha permitido la comprensión de las desregulaciones que presentan los genes de expresión de este cáncer, dentro de las cuales las más importantes se han considerado la pérdida del cromosoma 14, por hipometilación del ADN, transducción de señales y alteraciones en el proceso de apoptosis como por ejemplo en la familia Bcl-2, p53, p16, N-ras, y NF-kB (Manikhandan AV, et al. 2013; Nasir L & Argyle DJ, 1999; Veldhoen N, et al. 1998). Se ha encontrado que existen algunas superposiciones para el desarrollo de linfoma de células B y células T tomando

de gran importancia las mutaciones somáticas que pudieran ocurrir en TRAF3-MAP3K14, FBXW7 y POT1, desarrollando mayoritariamente un linfoma de células B y una menor incidencia en linfoma de células T (Elvers I, et al. 2015).

Factores infecciosos

El virus Epstein-Barr anteriormente había sido vinculado con el desarrollo de linfoma en seres humanos y posteriormente se tuvo la hipótesis que pudiera estar implicado en el desarrollo de linfoma canino, sin embargo, mediante pruebas de diagnóstico moleculares y serológicas se demostró que no existe relación entre el virus, con el desarrollo de linfoma (Waugh EM et al, 2015; Milman G et al, 2011).

Por otro lado, la microbiota intestinal es considerada como un factor de gran importancia para la susceptibilidad que pueden tener los caninos para el desarrollo de ciertos tumores (Gavazza et al. 2017). La Organización Mundial de la Salud en el año 2003 estableció una clasificación histológica de los tumores con mayor presentación y desarrollo del sistema digestivo de los animales domésticos, donde se encontraron más de 50 diversos tipos de tumores (Head KW et al. 2003). La edad promedio de los perros que desarrollan linfoma intestinal primario se ha registrado entre los 6 a 8 años y con una mayor incidencia de desarrollo en machos (Patnaik et al, 1977; Twedt DC., 1992). Se ha demostrado que existe una mayor incidencia de desarrollo de tumores gástricos en razas como pastor belga, rough collie, bull terrier y staffordshire (Blackwood L, et al., 1997; Fonda D, et al., 1989; Scanziani E, et al., 1991).

Factores ambientales

En un estudio realizado por Takashima-Uebelhoer BB en 2012, demostró la relación que tiene el impacto de diversos herbicidas con el desarrollo de linfoma tanto en seres humanos como en perros, tomando el ácido fenoxiacético, particularmente el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) como principales. Existen investigaciones donde demostraron que los factores ambientales tienen un papel importante para el desarrollo de linfoma canino con el uso de los químicos que son utilizados para el cuidado del césped, principalmente los pesticidas. Por otro lado, el uso de los productos que son utilizados para el control de las pulgas y garrapatas no se han representado como productos que

podrían impactar en la incidencia del desarrollo de linfoma. En el caso de los seres humanos se ha comprobado que las personas con residencia en las áreas industriales que tienden a hacer uso de productos químicos como lo son solventes o pinturas tienden a desarrollar linfoma (Gavazza A, et al. 2008). La exposición al humo de tabaco también ha sido considerada como un factor importante de riesgo en el desarrollo de LNH en humanos (Pinello KC et al. 2017).

Factores inmunológicos

El sistema inmunológico tiene un papel de suma importancia para la aparición y desarrollo de linfoma, debido a que si los pacientes tienen una inmunosupresión presente tendrán mayor probabilidad de desarrollar este cáncer. Algunas de las alteraciones que se pueden encontrar son trombocitopenia inmunomediada (Keller ET, 1992).

Existe un estudio donde se asocia el desarrollo de linfoma no epiteliotrópico de células T en un paciente canino en base a una dermatitis atópica, sin embargo, no se ha comprobado si su desarrollo está asociado con la enfermedad primaria o con los tratamientos utilizados que se basan principalmente en la aplicación de inmunomoduladores (Santoro D et al, 2007).

Se han reconocido cinco presentaciones anatómicas de linfosarcoma: Digestiva, Mediastínica, Cutánea, Extranodular, y Multicéntrica. Siendo esta última la presentación con mayor porcentaje en los caninos, abarcando alrededor de un 80% (Flores & Del Riego, 2012).

La clasificación anatómica, así como la frecuencia, signos clínicos y algunas lesiones que se presentan al desarrollar en pacientes con linfoma canino son variables y tienen dependencia de acuerdo con la extensión alcanzada y la ubicación de esta neoplasia. Ver tabla 1

Tabla 1. Características clínicas presentes en los pacientes caninos al desarrollar linfoma de acuerdo con su clasificación anatómica y su frecuencia relativa.

Clasificación Anatómica	Frecuencia	Signos clínicos	Pruebas de diagnóstico recomendadas	Diagnóstico diferencial
Multicéntrica	80%	Linfadenopatía general o localizada, pudiendo ser indolora. Poliuria/Polidipsia Hipercalcemia Signos clínicos inespecíficos como pérdida de peso, y letargia. Esplenomegalia. Hepatomegalia.	Biopsia del ganglio linfático afectado. Aspiración de aguja fina.	Infecciones diseminadas pudiendo ser provocadas por virus, bacterias, parasitarias, fúngicas y rickettsiales.
Digestiva	7%	Engrosamiento de las asas intestinales. Masa abdominal posiblemente palpable Signos clínicos inespecíficos como vómito, diarrea y pérdida de peso.	Biopsia guiada por ultrasonidos FNA. Ecografía Radiografía Endoscopia	Diversas neoplasias gastrointestinales Cuerpo extraño Enteritis linfocítica Enteritis Plasmocítica
Mediastínica	5%	Poliuria/Polidipsia como secundario a la presentación de hipercalcemia. Disnea/Taquipnea debido al espacio que puede ocupar al desarrollar la masa o efusión pleural. Síndrome precava.	Biopsia Radiografías torácicas Ultrasonido TAC Aspiración por aguja fina En caso de existir líquido pleural, realizar su evaluación.	Diversos tumores como timoma, quemodectoma, carcinoma de tiroides ectópico, carcinomatosis pleural, granulomatosis linfomatoide pulmonar. Diversas enfermedades infecciosas como enfermedad granulomatosa. Insuficiencia cardiaca de origen congénito Quilotórax Hemotórax
Cutánea	6%	Puede presentarse de manera generalizada o localizada Alopecia escamosa Engrosamiento eritematoso Prurito Lesiones parecidas a placas	Biopsia Punzón dérmico múltiple	Dermatitis infecciosa Dermatitis inmunomediada Diversas neoplasias cutáneas.
Extranodular	3%	Signos clínicos inespecíficos pudiendo afectar a SNC, cavidad nasal, cavidad ocular, óseos, y cardíacos.	Biopsia de tejidos o fluidos de las zonas afectadas Técnicas de imagen aplicadas en la zona de afectación	Pueden ser variables dependiendo del órgano, sistema o región involucrada

James M. Dobson, B. & Duncan X. Lascelles 2014. Manual de Oncología en pequeños animales. pp. 419-428.

Presentación del linfoma canino de acuerdo con su clasificación anatómica

El linfoma multicéntrico se presenta mayormente por una linfadenopatía ya sea generalizada o específica (Madewell B, 1987). Los ganglios linfáticos son los que se ven mayormente afectados sufriendo un agrandamiento palpable, aunque en algunos pacientes puede llegar a ser indoloro e incluso pueden ser ganglios discretos. Este tipo de presentación puede llegar a afectar a médula ósea y como consecuencia provocar una hepatoesplenomegalia. Rara vez los pacientes que desarrollan este tipo de linfoma presentan cambios sistemáticos y la linfadenopatía se considera como uno de los signos clínicos más importantes, sin embargo, también se presentan signos clínicos inespecíficos que no permiten la detección o sospecha temprana de que se trata de una neoplasia (Blackwood L et al, 1997).

El linfoma digestivo o también conocido como gastrointestinal, suele presentarse con signos clínicos inespecíficos como pérdida de peso, vómito y mala absorción (Couto KM et al, 2018). Esta presentación abarca entre el 5% al 7% de los linfomas caninos, que pueden causar engrosamiento en pared, y con frecuencia puede provocar ulceraciones en mucosa (Couto CG et al, 1989). Han sido pocos los informes que determinan el inmunofenotipo de las poblaciones de linfoma gastrointestinal en perros, anteriormente se consideraba que este tipo de presentación era originario a partir de células B, sin embargo, al paso del tiempo y a incidencias recientes se ha evidenciado que la mayoría de los linfomas gastrointestinales surgen a partir de las células T, y además pueden llegar a presentar epiteliotropismo (Ozaki K et al., 2006; Coyle KA & Steinberg G, 2004).

El linfoma mediastínico se presenta en un 4% a 5% y se caracteriza principalmente por desarrollar un agrandamiento en el timo o afectando también a las estructuras y los ganglios craneales del mediastino, por lo que esta presentación provoca problemas respiratorios a los pacientes. Uno de los principales signos clínicos que permiten la sospecha de linfoma es la hipercalcemia, que estará acompañada de poliuria o polidipsia. Sin embargo, también presenta signos clínicos inespecíficos como la intolerancia al ejercicio, debido a la masa que se encuentra ocupando el espacio e incluso pudiendo existir un derrame pleural. Por otro lado, también el desarrollo de esta neoplasia puede provocar una compresión tumoral o una invasión de la vena craneal, y como consecuencia

secundaria puede provocar un edema con fóvea, destacando en cabeza, cuello y extremidades torácicas (Ruslander DA, et al, 1997).

El linfoma cutáneo se puede encontrar de forma generalizada o solitaria y se puede clasificar como linfoma epiteliotrópico o no epiteliotrópico. Visualmente se puede caracterizar por la afectación que tiene en la dermis en forma periférica grande, pudiendo abarcar incluso un promedio de 15-21 μm de diámetro, incluso pueden llegar a tomar formas de nódulos o placas. Esta presentación histológica afecta principalmente a las porciones media y profunda de la dermis y abarca alrededor de un 6% (Gross T et al, 2005). Los tumores se presentan como nódulos que pueden ser palpables, tener apariencia de placas y provocar en los pacientes úlceras y dermatitis intermitente o exfoliativa, también provocando la hipopigmentación focal y provocando que se originen las zonas alopécicas. Cuando el proceso clínico sigue, la piel comienza a tornarse eritematosa, engrosada, provocando úlceras progresivas y posteriores exudados (Chan CM et al, 2018). Se ha considerado que el linfoma cutáneo en ambas clasificaciones se origina a partir de las células T, y se ha descrito para humanos con presencia de células CD4 y caninos con células CD8 (Fontaine J et al, 2010; Moore PF et al, 2009; Moore PF et al, 1994).

El linfoma extranodular abarca un 3% y los signos clínicos pueden considerarse inespecíficos o depende mucho del órgano, sistema o localización que se encuentra involucrado. Las lesiones en esta presentación pueden ser generalizadas, solitarias o multifocales (Fontaine J et al, 2010) y puede desarrollarse a partir de tejidos no linfoides, incluyendo sistema nervioso, sistema ocular, cavidad nasal, entre otros. Se ha encontrado en humanos y canes una afectación hepatoesplénica, pero es poco frecuente y generalmente se ha encontrado vinculada a originarse a partir de las células T (Keller SM, et al. 2016; Fry MM, et al. 2003). En la literatura se ha mencionado que el inmunofenotipo para estas formas extranodulares ha sido de células B en humanos, pero para el caso de los caninos se ha informado que es el fenotipo de células T (Dargent FJ, et al. 1988; McDonough SP et al., 2002). Esta presentación puede provocar afecciones mucocutáneas orales, y puede tener una presentación eritematosa multicéntrica, debido a que provoca lesiones en forma de nódulos o placas en los labios y en algunas ocasiones afectando también a las encías.

El linfoma cutáneo puede provocar el desarrollo de linfoma extranodular debido a que se ven afectados los labios, párpados, cavidad nasal, y pliegues interdigitales.

En el caso de verse afectado el SNC se observan mayormente en las regiones meníngeas, perivasculares y periventriculares, cuando se trata de un linfoma de células B; mientras que para un linfoma de células T, se considera que los nervios periféricos cuentan con una mayor probabilidad de verse afectados y con ello provocar algunos signos clínicos como parálisis, convulsiones y paresia (Siso Sm Marco-salazar P & Moore P, 2017).

La cavidad ocular puede verse afectada como una lesión secundaria a linfoma multicéntrico provocando infiltraciones y/o engrosamiento del iris, hipopión, uveítis, y glaucoma. En algunos estudios sobre esta presentación se ha determinado que no se encuentra una afectación en el sistema relevante (Krohne SDGVW et al, 1987).

En la literatura se ha mencionado que el linfoma canino puede estar relacionado con el desarrollo de enfermedades paraneoplásicas, como la anemia y la hipercalcemia, las cuales tienen semejanza en los signos clínicos específicos como lo son la pérdida de peso, letargia, debilidad muscular, poliuria y polidipsia por mencionar algunos. La hipercalcemia, que puede ser desarrolla a causa de linfoma, es el resultado del péptido relacionado con la hormona que regula la tiroides (PTHrP), que es elaborado por las células cancerígenas (Rosol TJ & Capen CC, 1992).

Clasificación por inmunofenotipo

El linfoma tiende a originarse a partir de expansiones de manera clonal de los linfocitos, sin embargo, cuentan con características inmunofenotípicas y morfológicas distintas. Se ha utilizado principalmente el estudio histológico para poder determinar la clasificación de LNH en humanos y linfoma canino (Valli VE et al, 2013). La clasificación de linfoma de manera histológica se da tomando en cuenta los siguientes criterios: anatomía, morfología, e inmunofenotipo al que pertenece siendo de células B o de células T (Ponce F et al, 2010).

El linfoma canino se ha presentado con mayor frecuencia en sus siguientes categorías: Linfoma difuso de células B (DLBCL), Linfoma periférico de células T no específico

(PTCL-NOS), Linfoma de la zona T (TZL), Linfoma linfoblástico T, Linfoma de zona marginal (MZL) (Valli VE, et al, 2013).

La clasificación de linfoma canino se considera que será cada vez de mayor importancia debido a que con ello se pueden tener mejores estudios acerca de su comportamiento biológico, y así poder otorgar un tratamiento más específico. Por otro lado, poder monitorear la respuesta del paciente al tratamiento, y así obtener con mayor precisión un pronóstico clínico (Valli VE, et al, 2011). Con la obtención de algunos resultados preliminares de pacientes que han desarrollado linfoma, se observó que existen casos donde los niveles de apetito y actividades cotidianas se mantienen en niveles normales, incluso si se trata de un linfoma en una etapa considerablemente avanzada, como fue el caso de linfoma de zona marginal (MZL), linfoma folicular, linfoma de células pequeñas de células B y T, y linfoma de la zona T (Valli VE et al, 2006). Por otro lado, existen otros sistemas que permiten la clasificación de linfoma, como el Instituto Nacional del Cáncer basándose en el Working Formulation (WF) y el sistema Kiel. Sin embargo, la mayor parte de ellas coinciden en la clasificación de acuerdo con los grados en los que se presentan, considerando los niveles, bajo, intermedio y alto. La WF los clasifica si es difuso o folicular, sin embargo, no describe el inmunofenotipo al que pertenece, esta clasificación comprende mayormente la biología que presenta la neoplasia, así como la supervivencia que tiene el paciente. (National Cancer Institute). El sistema de Kiel, con su clasificación permite la identificación de la morfología ya sea centroblástica, centrocítica o inmunoblástica, así como también permite determinar el inmunofenotipo al que pertenece el linfoma, siendo de células B o células T (Lennert KFA, 1990).

Por otra parte, solamente un pequeño porcentaje de los linfomas caninos se considera de bajo grado, siendo alrededor de un 5.3% a 29% debido a que la mayoría de los casos presentados son atendidos cuando el desarrollo de la neoplasia se encuentra en un estado muy avanzado (Carter RF et al, 1986).

Se ha mencionado anteriormente que esta neoplasia ha presentado diversos factores de predisposición dentro de los cuales destaca el factor racial, se ha descrito que existe una prevalencia de linfoma de células B en las razas Cocker Spaniel, y Doberman Pinschers,

(Bromberek JL, et al. 2016). mientras que los Bóxer, y Golden Retriever tienden a tener mayor predisposición por el desarrollo de linfoma de células T (Hughes KL et al, 2018).

Algunos investigadores consideran que un porcentaje que abarca del 60% al 80% tiende a pertenecer a linfoma canino de células B, mientras que el linfoma canino de células T alrededor de un 10% a un 38%; los linfomas de categoría mixta alrededor de un 22%, mientras que las neoplasias pertenecientes a células nulas tienen a ser incluso menor a un 5% (Ernst T et al., 2016; Vail DM, et al., 1996; Ruslander DA et al., 1997; Geenlee PG et al., 1990; Wilkerson MJ et al., 2005).

Diagnóstico clínico de linfoma canino

Debido a que este tipo de neoplasia tiene diversas formas de presentación, se debe de realizar una buena evaluación diagnóstica, donde se incluyan las pruebas de laboratorio rutinarias para abarcar de una manera más eficiente su diagnóstico. Se debe de incluir la realización pertinente y adecuada de un examen físico, así como exámenes clínicos que abarquen biometría hemática, que permitirá realizar los recuentos diferenciales de los leucocitos y plaquetas, análisis de orina, perfil bioquímico, biopsias del tejido afectado, citologías e incluso se sugiere realizar la medición de calcio ionizado, así como también, la aspiración con aguja fina de la médula ósea. Esto con la intención de reducir ampliamente los diagnósticos diferenciales que se descubrieron anteriormente.

Examen físico

Se debe de realizar un examen completo donde se lleve a cabo la palpación de todos los ganglios linfáticos, incluso aquellos que a primera vista no sean de gran atención. Se recomienda también realizar un examen rectal debido a que en los pacientes se pueden encontrar pólipos rectales que son originados por los linfocitos neoplásicos. También se considera importante realizar una evaluación de las membranas mucosas con el fin de descartar o detectar anemia o trombocitopenia. La palpación abdominal es importante debido a que se pueden detectar masas o sospechas que conlleven a realizar otras pruebas de laboratorio como radiografías, esto permite identificar si existe organomegalia, o engrosamiento de la pared del intestino, presencia de alguna masa mediastínica o derrame pleural posterior a la auscultación. Examen ocular para evaluar si existe la presencia de

anomalías como uveítis o infiltración ocular, que son los más comunes en el linfoma (Krohne SDGVW et al, 1987).

Pruebas de laboratorio

Dentro de estas pruebas se incluyen una biometría hemática, perfil bioquímico y uroanálisis. En el caso de linfoma canino la anemia se considera como uno de los principales signos clínicos, esta suele ser normocítica normocrómica no regenerativa, y suele llegar a ser un diagnóstico con un bajo pronóstico de vida sana de los pacientes, además puede llegar a estar acompañado de trombocitopenia y leucopenia (Madwell BR & Feldman BF, 1980). La neutrofilia y la linfocitosis también se pueden encontrar presentes, sin embargo, ocurre en menos del 40%, sin embargo, esto puede ser un gran indicador de que la región más afectada se encuentra en la médula ósea, en este caso se debe de tener cuidado con el diagnóstico diferencial de leucemia (MacEwen EG & Hurvitz AI, 1977). Por otro lado, se pueden encontrar anomalías bioquímicas en el suero y con ello, se puede detectar la presencia de algunos síndromes paraneoplásicos, como es el caso de la hipercalcemia, que es un signo clínico de gran importancia en el desarrollo de linfoma canino.

Histología y citología

Es recomendable tomar biopsias de ganglios que no sean reactivos como los que se encuentran en la mandíbula. Los ganglios que se toman con preferencia son los preescapulares y los poplíteos. Los linfocitos son células altamente frágiles que deben de tener cuidado al momento de procesar las muestras, tanto para la histología como en el material obtenido a partir de la aspiración de aguja fina (Seelig DM. et al., 2016). En algunos linfomas, los linfocitos intermedios y los neutrófilos llegan a ser similares en cuanto a su diámetro, sin embargo, los linfocitos son predominantes. Los linfomas de células pequeñas pueden llegar a ser complicados debido a que no se tienen muchos recursos citológicos y con ello puede interferir en la detección de malignidad (Ku CK, et al. 2017). La pérdida de la estructura dada por los linfocitos neoplásicos y la ruptura capsular son los principales hallazgos de importancia. Aunque esta técnica de diagnóstico es de las más utilizadas para la detección de linfoma canino, puede presentar algunas desventajas como el necesitar de personal altamente capacitado para poder determinar un

diagnóstico certero, además en casos ambiguos donde no se puede confirmar un diagnóstico es necesario realizar ensayos de clonalidad y análisis citogenéticos.

Generalidades de linfoma en humanos

La incidencia de linfoma en humanos es altamente variable en comparación con el linfoma canino, se tienen reportes donde se observa que en la mayoría de los casos que se han presentado en adultos, aproximadamente el 80% se deriva a partir de las células B, mientras que en pacientes jóvenes se reporta que el 60% se deriva de las células T (Anderson T et al, 1982).

Existen generalidades que se presentan en los seres humanos al desarrollar el linfoma, y se ha reportado en la literatura y en clínicas veterinarias especializadas en la oncología veterinaria que estos signos y etapas tienen una gran similitud con el linfoma canino. Ver Tabla 2

Tabla 2. Clasificación Ann Arbor de linfoma determinando el grado de propagación en los pacientes.

Etapa I	<ul style="list-style-type: none"> -Se encuentra afectando solamente a un ganglio linfático o un solo órgano. (I). -Se encuentra afectando solamente un órgano que se encuentra fuera del sistema linfático. (IE). -Una región de ganglio linfático puede abarcar un solo nódulo o nódulos adyacentes.
Etapa II	<ul style="list-style-type: none"> -Se encuentra afectando a dos o más grupos de ganglios linfáticos en un mismo lado ya sea superior o inferior del diafragma. Puede incluir los nódulos del área axilar y cuello, sin embargo, no puede tener una combinación de los nódulos axilares y de la ingle. (II) -Se ha extendido de un solo grupo de ganglios linfáticos a los órganos cercanos. (IIE).
Etapa III	<ul style="list-style-type: none"> -Se encuentra afectando áreas de ganglios linfáticos de ambos lados, superiores e inferiores del diafragma. -Puede propagarse a un área y órgano próximo a los ganglios linfáticos. (IIE) (IIIS), (IIISE).
Etapa IV	<ul style="list-style-type: none"> -En esta etapa el linfoma se diseminado a partes no correspondientes del sistema linfático. -Puede encontrarse propagado en hígado, médula ósea.

Los linfocitos

Los linfocitos son aquellas células que forman parte del sistema inmunitario que tienen un papel de gran importancia para la formación de defensa del organismo ante cualquier agente extraño. Se reconocen principalmente tres tipos de linfocitos que corresponden a los linfocitos T, linfocitos B, y los Natural Killer, o también conocidos como células NK por sus siglas en inglés. La primera línea se encuentra con mayor frecuencia en la participación de la inmunidad adquirida, la segunda línea se concentra en la producción de los anticuerpos y la tercera se encuentra más durante la inmunidad innata. Es de gran importancia mencionar que dentro de esta línea de linfocitos se encuentran presentes gran cantidad de subpoblaciones, y que cada una de ellas cuenta con diversas funciones a realizar debido a que se desarrollan como poblaciones heterogéneas, sin embargo, estas células son muy específicas para generar respuestas debido a que en su estructura cuentan con una membrana que responde solamente a un receptor específico que genera la capacidad de interactuar solamente con un antígeno específico también (Janeway CA et al. 2003).

Estas células linfocíticas se encuentran distribuidas en la mayor parte del organismo tanto de los seres humanos como de los animales. Aproximadamente el 40% se encuentra en los nódulos linfáticos, un 10% en médula ósea, otro 10% en intestino, así como un 13% en bazo, otro 2% en sangre y un 25% en otros tejidos. Como se mencionó anteriormente, acerca de las subpoblaciones, cabe mencionar que estas no pueden llegar a ser específicamente identificadas basándose en la estructura que presentan, sin embargo, su identificación puede lograrse mediante las moléculas que presentan en su superficie, conociéndose como técnica de inmunofenotipo.

Clasificación de los linfocitos

Cada linfocito tiene características diferentes, comenzando por el lugar en el que tienen su desarrollo. Por ejemplo, los linfocitos B se desarrollan a partir de la médula ósea, y placas de Peyer, mientras que los linfocitos T a partir del timo; la distribución de los linfocitos B se da a través de los folículos esplénicos, y corteza de nódulos linfáticos, mientras que en los linfocitos T es en la paracorteza de nódulos linfáticos. Los linfocitos B no tienen circulación en sangre mientras que los linfocitos T si, ambos tienen diferentes

receptores de antígenos, para los linfocitos B se tiene la región BCR-inmunoglobulina, mientras que para los linfocitos T se tiene la región TCR. Pueden originar algunas células, los linfocitos B originan células plasmáticas y también linfocitos B de memoria, mientras que los linfocitos T originan linfocitos T efectores y también linfocitos T de memoria, y sus productos de secreción en los linfocitos B son las inmunoglobulinas y en linfocitos T citoquinas. Las estructuras que son las más importantes en cada uno de los linfocitos tanto los B como los T, son sus receptores de antígeno dentro de las cuales también se tienen subpoblaciones, para los linfocitos B se tienen γ , μ , α , ϵ , y δ , mientras que para los linfocitos T se tiene α , β , γ , y δ . Por otro lado, las células Natural Killer no cuentan con receptores específicos como en el caso de los linfocitos B y T, estas células pueden encontrarse o expresarse como células que se encuentran sanas (Ian Tizard, 2009).

Estructura de los linfocitos

Los linfocitos cuentan con sus receptores específicos, para los linfocitos B se tiene la región BCR, mientras que para los linfocitos T se tiene el TCR, estas células tienen precursores que se localizan en médula ósea, la región BCR reconocen principalmente a lo que se le denomina antígenos solubles, mientras que la región TCR reconoce a los antígenos peptídicos (Treanor B., 2012). A pesar de que tienen diferentes regiones tienen grandes similitudes en su estructura, como lo son las cadenas peptídicas que se encuentran unidas por puentes disulfuro, estos juegan el papel de mayor importancia debido a que son los que permiten que se lleven a cabo los reconocimientos antigénicos.

Mecanismos de generación de la gran diversidad de linfocitos B y linfocitos T

La cantidad de linfocitos que se encuentra en cada organismo es de aproximadamente 1×10^{15} , recordando que cada uno de ellos responde a antígenos diferentes, con la finalidad de proporcionar una mayor protección al organismo al enfrentarse a los agentes patógenos que se encuentran en la actualidad, así como prepararlos para los posibles existentes en el futuro, por lo que se entiende que la producción de receptores de antígenos específicos es alta, esto es necesario en ambos receptores específicos para los linfocitos T y los linfocitos B. El mecanismo mediante el cual da como resultado la producción de los diversos linfocitos ocurre de manera completamente al azar, y participan las diversas regiones que componen la estructura de los linfocitos, las regiones que participan son la región variable

(V), la región diversa (D), la región de unión (J), y la región constante (C), en el caso de los linfocitos B en sus cadenas ligeras no participa la región Diversa (D), a este proceso que permite la obtención de diversos linfocitos se le conoce como recombinación somática (Cobb RM, et al. 2006). La capacidad que adquieren los receptores para poder permitir la unión con un antígeno específico se da mediante la conformación del lugar de unión que se tiene a partir de esta recombinación somática. En este caso una gran variedad de genes puede codificar cada una de las regiones variables, mientras que en el caso de la región constante solamente se codifica uno solo. En el caso de las cadenas pesadas se tiene contemplado que están presentes al menos 50 regiones variables, 30 regiones diversas, 6 regiones de unión y 9 constantes, porque da un aproximado de 9,000 combinaciones posibles, mientras que en las cadenas ligeras un aproximado de 80 regiones variables, 8 regiones de unión y 4 regiones constantes, por lo que se tiene como resultado 500 combinaciones posibles, porque solamente la producción de este nuevo linfocito puede tener alrededor de 10^{15} combinaciones posibles a partir de esta recombinación somática. Este mecanismo permite que se obtenga una gran cantidad de diversos receptores para antígenos de los linfocitos B y T. El proceso de la recombinación somática está dado principalmente por dos enzimas recombinasas que se denominan RAG-1 y RAG-2, así como también las secuencias señalizadoras de la recombinación (RSS) (Giallourakis CC et al, 2010).

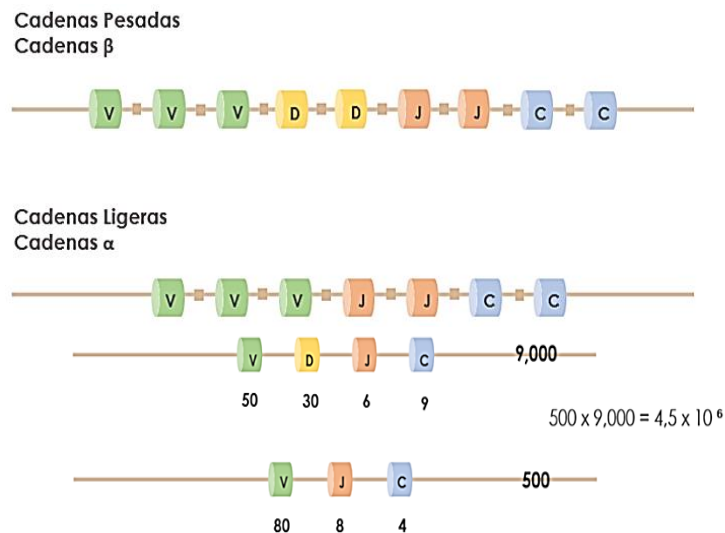


Figura 1.- Gran variedad de genes puede codificar cada una de las regiones (región Variable (V), la región Diversa (D), la región de unión (J), y la región constante (C),) modificado de Villamizar-Rivera 2015

Linfocitos T

Cada una de las células linfocíticas T tiene en su superficie una región TCR, en el caso de los seres humanos y en la gran mayoría de los mamíferos se ha encontrado que sus linfocitos T corresponden a tener de manera constante el receptor TCR con las cadenas α con peso molecular de 42 a 49 kDa, y β con peso molecular de 37 a 44 kDa, mientras que en los corderos y terneros se ha encontrado con mayor frecuencia la región TCR de las cadenas γ con un peso molecular de 35 a 46 kDa, y δ con un peso molecular de 49 kDa. Las cuatro cadenas presentes, tienen una gran similitud entre ellas, sin embargo, lo que pudiera llegar a cambiar es simplemente el peso molecular, la glucosilación es la que juega un papel importante para marcar la diferencia entre estos pesos, la cadena peptídica que conforma a la región de receptor específico de los linfocitos T se compone principalmente de los cuatro dominios mencionados anteriormente. La región variable la cual está compuesta por al menos 100 aminoácidos y esta secuencia puede tener como lo indica su nombre diversas variaciones a partir de cada linfocito, la región constante se compone alrededor de unos 150 aminoácidos, sin embargo a diferencia del anterior y como su nombre lo indica no presenta variaciones, el dominio transmembrana consta de aproximadamente 20 aminoácidos y estos tienen la capacidad de poder atravesar la membrana de cada uno de los linfocitos T, por último el dominio C terminal consta aún más de aminoácidos menores abarcando solamente de 5 a 15, y este se encuentra dentro del citoplasma de los linfocitos.

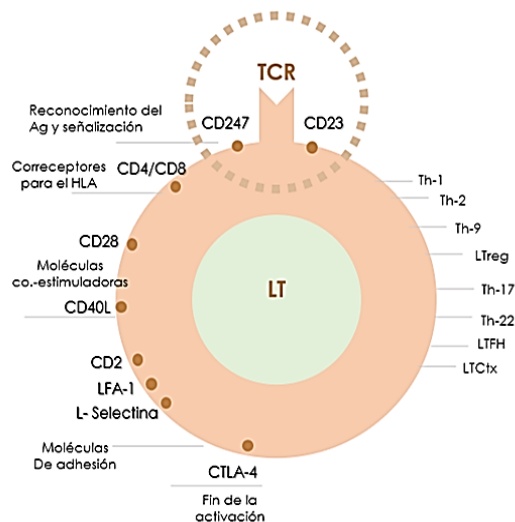


Figura 2.- Esquema del complejo TCR de los linfocitos T tomado y modificado de Rojas 2012

En cuanto a la estructura en general del receptor específico TCR, se encuentra conformado por dos cadenas peptídicas que son unidas mediante puentes disulfuro localizados en sus regiones constantes para permitir la formación estable de un heterodímero, esto da un aspecto parecido a la formación de bloques en construcción, la región TCR tiene dos cadenas que se encuentran casi emparejadas, sobre las regiones constantes se encuentran las regiones variables que permite la accesibilidad junto con las moléculas del CMH. Se debe de tener en cuenta que las regiones variables pueden modificar las formas de presentación del receptor específico debido al número de aminoácidos que están presentes en la formación de esta cadena, y esta es la que específicamente permite la respuesta ante diversos antígenos, a esta región también se le puede encontrar con el nombre de región determinante de complementariedad o mejor conocido como CDR. La unión que se da entonces entre la región TCR al antígeno es la que permite que se genere una respuesta que posteriormente pasa por un proceso que permitirá que el linfocito T sea activado mediante la traducción de esta señal.

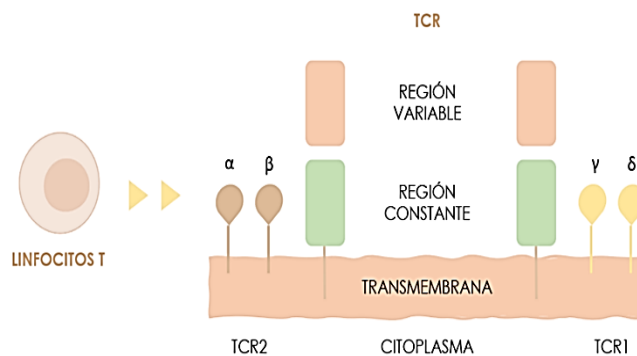


Figura 3 Estructura del receptor de linfocitos T y su complejo TCR modificada de Murphy Kenneth 2009

Linfocitos B

De manera similar que los linfocitos T, los linfocitos B, pueden unirse y generar respuesta ante solamente un antígeno. Estos receptores de antígeno suceden completamente al azar como se mencionó anteriormente, los linfocitos B se encuentran localizados principalmente en la corteza de los nódulos linfáticos, médula ósea, zona marginal del bazo, placas de Peyer y aunque en poca cantidad algunos pueden encontrarse por vía

sanguínea. El receptor de antígeno específico en el caso de los linfocitos B se conoce como BCR, esta región se encuentra conformada por alrededor de 500.000 receptores idénticos. Esta región se encuentra conformada de una manera similar a la estructura del TCR, contando también con sus elementos esenciales que permiten la unión al antígeno y la traducción de señal que permite la activación de los linfocitos B. El receptor de antígeno específico BCR tiene una estructura similar a la de una inmunoglobulina, está compuesto por una glucoproteína que tiene un peso molecular alrededor de 159 a 180 kDa, esta región además está constituida por otras cuatro cadenas peptídicas o también denominadas dos de ellas como cadenas pesadas y las otras dos como cadenas ligeras, las cadenas pesadas tienen un peso molecular individual de aproximadamente 59 kDa, mientras que las cadenas ligeras con un peso molecular individual aproximado de 24 kD. El receptor BCR tiene una apariencia parecida a la letra Y gracias a sus dos tipos de cadenas presentes, estas cadenas se encuentran unidas por puentes disulfuro, las cadenas que se encuentran ancladas a la bicapa lipídica de la membrana del linfocito B corresponde a las cadenas pesadas, las partes superiores a las cadenas pesadas que dan similitud a los brazos de la letra y están formadas por pares de cadenas pesadas y ligeras, y entre ellas tiene la formación de una hendidura y es aquí donde tienen unión los antígenos, por lo que da como resultado que esta región específica tenga dos sitios idénticos para permitir la unión de estos antígenos.

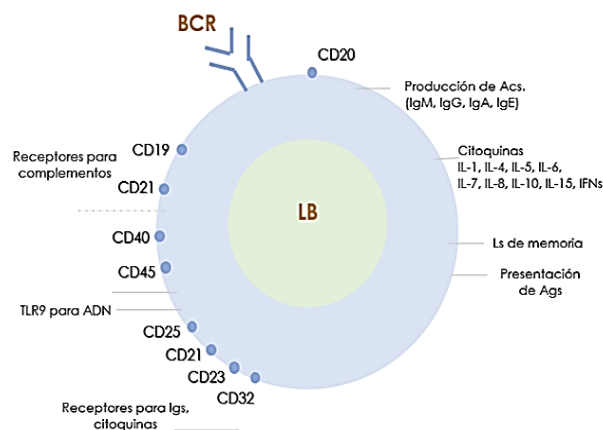


Figura 4.- Receptor de la Célula linfocítica B y su receptor BCR tomado y modificado de Rojas 2012

Las cadenas ligeras de los linfocitos B se encuentran conformadas por una cadena de aminoácidos de no más de 110 cada una, esto da origen a su región constante que no

presenta ningún posible cambio, sin embargo, al igual que en el caso del receptor de linfocitos T, las secuencias que se encuentran en el dominio N-terminal puede presentar variaciones para poder permitir la unión a diversos antígenos, por lo que a esta región en estas cadenas se le denomina su región variable. Por otro lado, las cadenas pesadas están compuestas por cuatro o cinco regiones de al menos unos 100 aminoácidos cada una de ellas, también presentan un dominio N-terminal con sus regiones variables, mientras que las otras cuatro o tres regiones al no presentar tantos cambios determinados reciben los nombres de regiones constantes (Ian Tizard, 2009).

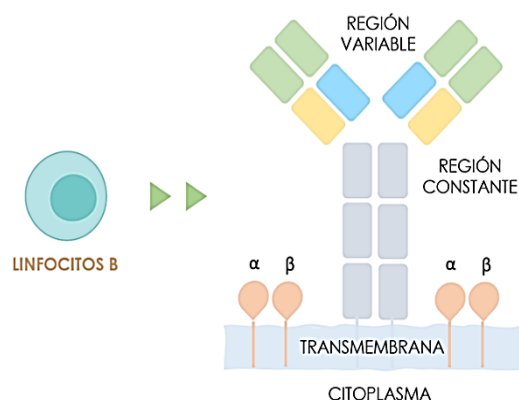


Figura 5.- Estructura del receptor de linfocitos B y su complejo BCR modificada de Murphy Kenneth 2009

El linfoma canino es un cáncer que se origina a partir de las células linfocíticas, para poder realizar un diagnóstico se deben de identificar las anomalías de estas células de diferentes maneras, así como también se puede estudiar el reordenamiento que tienen cada uno de los linfocitos. Para poder hacer un diagnóstico de linfoma canino se deben de tomar en cuenta la morfología que presentan las células, y su inmunofenotipo, sin embargo, no siempre es posible tener un diagnóstico certero (Swerdlow SH et al., 2008). En el caso de no poder obtener un diagnóstico certero, los pacientes presentan grandes desventajas en cuanto a su salud, principalmente por no tomar el tratamiento adecuado, además que pueden ser sometidos a estudios que no permitan identificar que se trata de una neoplasia canina, en este caso de linfoma. A continuación, se describen algunos de los métodos de

diagnóstico disponibles para el linfoma canino, sin embargo, algunos de ellos en la actualidad pueden presentar algunas desventajas en cuanto a tiempo de obtención de resultados.

Técnicas de diagnóstico molecular

En la actualidad las técnicas moleculares son mayormente utilizadas para la caracterización de la clase de linfoma canino que se esté presentando y así poder obtener mayor información sobre cada tipo de linfoma en cuanto a su desarrollo, forma de presentación y con ello poder permitir incluso un tratamiento efectivo que permita una completa remisión, debido a que no se tienen estudios o metodologías completamente desarrolladas para detectar al 100% el linfoma canino, estas técnicas se pueden llegar a acompañar de los diagnósticos iniciales mediante exámenes clínicos o pruebas de laboratorio básicas como se mencionó anteriormente (Seelig DM et al., 2016). Dentro de las técnicas moleculares que permiten un mejor análisis de los casos detectados con linfoma canino se encuentran análisis mediante histoquímica, análisis citoquímicos, inmunohistoquímicos, e incluso también análisis mediante citometría de flujo, y mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o mejor conocida como la PCR, (Flood-Knapik KE. et al., 2012). (Wilkerson MJ et al., 2005). Por otro lado, se han dado a conocer también los análisis de expresión de antígenos, y análisis de clonalidad de antígenos (Poggi A, et al. 2016). (Kaneko N et al., 2009). Estos métodos de diagnóstico han sido de mucha utilidad para la caracterización de los linfomas y estudiar su desarrollo más a profundidad, además que permiten una comprensión del mismo cáncer, y han sido de gran utilidad para poder otorgar tratamientos a los pacientes, por lo que se considera que tienen buenos potenciales de pronóstico, sin embargo, en la actualidad no se han implementado correctamente como estudios preliminares para la clínica veterinaria (Tonormura N et al., 2015). (Frantz AM et al., 2012).

Determinación del inmunofenotipo en el linfoma

Poder determinar el inmunofenotipo del linfoma es de gran utilidad e importancia para identificar las células que están presentes en la neoplasia, debido a que con esta información se puede llegar a un mejor diagnóstico y con ello poder predecir el pronóstico esperado para el paciente, debido a que se ha encontrado en la literatura que en la mayoría

de los casos que se han presentado, aquellos pacientes que desarrollan linfoma de las células T puede ser más agresivo que aquellos que desarrollan un linfoma de células B, sin embargo, en la actualidad no se ha realizado algún estudio donde esto pueda comprobarse certeramente, debido a que puede llegar a variar mucho de acuerdo a la región donde se encuentren los pacientes (Fisher DJ et al., 1995).

El inmunofenotipo de estas células es determinado principalmente mediante la expresión de las moléculas específicas que tiene cada uno de estos linfocitos, existen específicos para cada uno de ellos, diferenciándolos, siendo linfocitos B o linfocitos T, para células T se pueden utilizar los CD79 y CD20, mientras que para las células B utilizando el CD3 (Seelig DM et al., 2016).

Clonalidad en el linfoma canino

Los ensayos de clonalidad en el linfoma canino tienen gran relevancia debido a que en la actualidad los diagnósticos se basan solamente mediante los exámenes físicos de los pacientes y los exámenes preliminares como los histológicos y citológicos que no permiten la diferenciación simple del diagnóstico benigno o maligno de linfoma mediante su proliferación, por lo que este tipo de ensayos ha comenzado a tratarse para tener una confirmación de estos diagnósticos, además que la clonalidad es una característica específica de las células que permite identificar en el caso de linfoma su malignidad, pues recordemos que al presentarse esta neoplasia la expansión clonal que se va a tener presente en el paciente será una clonalidad maligna. Si se trata de un linfoma de células B o células T, la expansión clonal resultante deberá tener la misma secuencia de DNA de la que se está derivando la clonalidad maligna, de acuerdo con las regiones variables, que son las que tienen la capacidad de cambiar constantemente y entonces serán idénticas en cuanto a sus receptores. A este desarrollo de clonalidad maligna al ser la misma descendencia se le conoce como monoclonalidad. Por otro lado, se tiene también presente una linfocitosis reactiva, pero en este caso la forma de presentación de estas células es de manera policlonal, porque tienen receptores completamente diferentes en cada una de ellas y esto permite la diferenciación de la malignidad de una neoplasia. La técnica de Reacción de la Cadena Polimerasa (PCR) se ha propuesto como método que permita la amplificación de las regiones que son variables en cada uno de los linfocitos en

sus receptores y que con esto pueda detectarse la clonalidad que se encuentra en las poblaciones de linfocitos en los pacientes y con ello diferenciarlos a un tiempo apropiado y proporcionar un diagnóstico certero (Takanosu M & Kagawa Y 2015). (Keller SM et al., 2016). En la literatura se menciona que existen ensayos de clonalidad que han sido practicados en la medicina y que tienen una sensibilidad considerablemente alta abarcando hasta un 90%, la tasa que arroja resultados falsos positivos es muy pequeña siendo alrededor de un 5%. Sin embargo, investigaciones recientes, no descartan que algunos de los resultados pueden arrojarse como falsos positivos o falsos negativos, este tipo de resultados puede darse debido a que los primers que fueron utilizados no son detectados correctamente en el segmento de clonalidad del DNA, se encuentran presentes células linfocíticas que no son neoplásicas que interfieren para la detección, así como también pueden estar presentes las células NK, o incluso las células linfocíticas que si son neoplásicas de encuentran en una frecuencia muy baja que impide que se puedan detectar correctamente.

Este tipo de estudios, de acuerdo con que siguen en desarrollo para mejorar, se acompañan de las otras pruebas físicas y de laboratorio necesarias, se considera que pueden tener una mayor participación para poder tener un pronóstico de vida de los pacientes, y poder determinar la etapa en la que se encuentra desarrollándose el linfoma, así como también para la valoración de las recaídas que se pueden tener en el futuro (Avery A, 2009).

Justificación

En la actualidad se tienen principalmente dos métodos de diagnóstico preferenciales para determinar la presencia de linfoma canino, sin embargo, no siempre se cuenta con el personal capacitado para poder realizar este tipo de diagnósticos o los materiales necesarios de laboratorio, además que en algunos casos puede ser de alto costo para procesar la muestras para los propietarios, o el tiempo de obtención de resultados es algo largo incluso hasta de dos semanas, por lo que se propone estandarizar un método de diagnóstico molecular basado en un PCR punto final, que permita un diagnóstico eficaz en un menor tiempo para con ello poder otorgar un tratamiento adecuado a los pacientes y con este método poder determinar a qué linaje pertenece y con ello poder predecir un pronóstico de vida de los pacientes.

Hipótesis

Mediante la técnica molecular PCR punto final podrá determinarse la genotipificación del linfoma canino, siendo de células B o células T, a partir de sus receptores específicos BCR y TCR.

Objetivo General

Estandarización de la técnica molecular de PCR punto final para la diferenciación de una enfermedad linfoproliferativa de un linfoma.

Objetivos Específicos

1. Estandarización de la técnica PCR punto final para la detección del ordenamiento celular que determina el linaje del linfoma mediante muestras incluidas en cubos de parafina. (Linfocitos B o linfocitos T).
2. Detección del ordenamiento monoclonal mediante la técnica PCR punto final para determinar el linaje de linfoma en muestras de tejido incluidos en formalina de pacientes sospechosos a linfoma canino. (Linfocitos B o linfocitos T).
3. Detección del ordenamiento monoclonal mediante la técnica PCR punto final para determinar el linaje de linfoma en muestras de sangre de pacientes sospechosos a linfoma canino. (Linfocitos B o linfocitos T).
4. Estandarización de la técnica PCR multiplex punto final para determinar el linaje de linfoma de las muestras de tejido incluidos en cubos de parafina, formalina, y muestras sanguíneas.

Materiales y métodos

Muestras

Las muestras que fueron utilizadas para poder realizar el trabajo de investigación fueron muestras positivas a linfoma canino, obtenidas a partir de muestras incluidas en bloques de parafina.

Por otro lado, fueron recolectadas 21 muestras sanguíneas y 16 muestras de tejido de ganglios linfáticos de pacientes que se presentaron a consultas con una linfadenopatía. Estas muestras de tejido fueron conservadas en formalina. Estas muestras provenientes de pacientes con desarrollo de este tipo de neoplasia fueron donadas por diversos departamentos pertenecientes a universidades y clínicas especializadas en la oncología veterinaria, dentro de las Universidades se encuentra el Departamento de Patología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Patología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por parte de las clínicas especializadas en oncología se contó con el apoyo de Dr. Jaime Eduardo Elizondo quien se especializa en realizar el diagnóstico histopatológico, La Rioja Animal Hospital, así como también se recibió el apoyo de los miembros pertenecientes a la Asociación Mexicana de Oncología Veterinaria.

Procesamiento de las muestras

El procesamiento de las muestras se realizó en los laboratorios de Genética y Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Las muestras fueron sometidas a diferentes procedimientos para poder obtener el DNA de cada una de ellas, para este paso, se utilizaron diversos kits de acuerdo con las condiciones en las que se encontraban las muestras, esto principalmente por la dependencia de propiedades con las que se traban, y para obtener resultados eficientes. Se utilizaron el kit QIAmp DNA FFPE Tissue, y el kit DNeasy Blood & Tissue, ambos de QIAGEN.

Las extracciones de DNA fueron realizadas dentro de una campana de bioseguridad con la finalidad de evitar contaminación de las muestras y del personal. Para realizar este

procedimiento fueron utilizados diferentes kits comerciales y se siguió el protocolo del fabricante, modificando algunos tiempos establecidos para poder obtener resultados mayormente eficientes, debido a que en los kits se menciona que se debe de utilizar solamente una cantidad muy diminuta de cada una de las muestras independientemente en el estado de conservación en la que se encuentre, las muestras que se utilizaron quedaron con cantidades que permiten conservarlas en condiciones adecuadas para un uso futuro de las mismas. Estos restantes de las muestras se conservaron en sus condiciones iniciales a temperatura ambiente, siendo de entre 15-20 °C.

Muestras de tejidos incluidas en bloques de parafina

Algunas de las muestras obtenidas contaban con datos de información acerca de los pacientes o las regiones donde fueron tomadas las muestras, sin embargo, la información no se incluía en todas las muestras, dentro de estos datos de información se incluía en nódulo obtenido y en algunos una clasificación que permitió identificar si son epiteliotropicos o no epiteliotropicos.

En total se obtuvieron 20 muestras incluidas en los cubos de parafina, de las cuales una perteneció a un nódulo linfático sin especificar de un canino de diez años, cuatro muestras fueron pertenecientes a la clasificación de linfomas no epiteliotropicos sin especificación de edades, siete a nódulos linfáticos retrofaríngeos con una edad de seis y siete años, tres de las muestras correspondieron a nódulos linfáticos preescapulares sin especificar edades y dos de ellos a nódulos linfáticos axilares sin especificación de edades.

Muestras de tejido incluidos en formalina

Se obtuvieron 16 muestras de tejidos incluidos en formalina, la información de datos recopilados de estas muestras incluye nombre, raza y edad perteneciente a cada uno de los pacientes. Once de las muestras son correspondientes a machos, y los cinco restantes corresponden a hembras, el promedio de edad en la que se presentó el linfoma fue de ocho a diez años. Las muestras se obtuvieron a partir de cinco ganglios retrofaríngeos, donde tres corresponden a machos y dos corresponden a hembra, cinco ganglios preescapulares, de los cuales uno fue obtenido de una hembra y los cuatro restantes de machos, cuatro a partir de ganglios poplíteos, siendo dos correspondientes de machos y uno de hembra, y

por último se obtuvieron dos ganglios axilares, correspondiendo uno a un macho y uno a hembra.

Muestras sanguíneas

Se obtuvieron 21 muestras de pacientes con recopilación de datos como nombre, raza y edad que presentaron las pacientes al acudir a revisión. Para estas muestras se pudo observar que se cumplía principalmente uno de los factores que pueden ayudar a la predisposición de desarrollo de linfoma que es la edad, siendo en promedio de seis a diez años. Entre otros factores de predisposición se encontraba la raza, en estas muestras la raza chihuahuena fueron los pacientes que se tuvieron con mayor presentación. Las muestras de estos pacientes corresponden a siete mestizos, de los cuales seis corresponden a ser machos y una hembra, otra raza presente fue la Basset Hound, uno de ellos corresponde a ser macho y una a hembra, los labradores también se encuentran dentro de las razas con mayor predisposición y aquí se encontraron dos labradores, ambos machos, la raza que no se menciona tanto como raza predisponente en la chihuahuena, sin embargo aquí se presentaron cuatro chihuahuenos, dos ellos machos y dos de ellos hembras, por otro lado, otra raza predisponente es la Cocker Spaniel, sin embargo, aquí se encontró solamente una muestra que corresponde a una hembra.

Extracción de DNA a partir de muestras incluidas en cubos de parafina y tejidos incluidos en formalina

Para las muestras incluidas en los cubos de parafina, así como también a las muestras de tejido incluido en formalina, de acuerdo con sus propiedades similares y de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes, se utilizó el kit QIAamp DNA FFPE Tissue de QIAGEN, este kit fue utilizado acorde a las condiciones establecidas por el fabricante, sin embargo, algunos tiempos fueron modificados para asegurar una mayor eficacia en los resultados obtenidos.

Este kit consiste principalmente en seis fases, siendo el primero el eliminado de parafina con ayuda del xilol, el lisado con la ayuda de la proteinasa k, un tratamiento con calor otorgada mediante la incubación a una temperatura de 90°C, la unión del DNA a la membrana, un lavado que permite la eliminación de posibles contaminantes residuales, y

por último la elución que permite la obtención del DNA purificado y concentrado de cada una de las muestras.

Para el proceso de extracción de DNA de cada una de las muestras incluidas en los cubos de parafina fue necesario realizarles cortes mediante el microtomo, cada uno de los cortes se hizo de 10 μm de grosor eliminando las primeras dos o tres secciones para evitar la contaminación debido a que la muestra pudo haberse encontrado expuesta a la contaminación del aire libre, estas secciones fueron colocadas en los tubos de microcentrífuga de 1.5 o 2ml que se adquirieron aparte del kit. En el caso de los tejidos que se encontraban incluidos en formalina, fue necesario realizar cortes pequeños y macerarlos para poder tener la cantidad de muestra necesaria, se debe de tomar en cuenta que la muestra no debe de ser muy grande para evitar que el resultado no sea favorable por la presencia de tanto material, posteriormente este material se coloca de igual manera dentro de los tubos de microcentrífuga y el procedimiento pasa a ser el mismo para ambos tipos de muestras.

Posteriormente a cada una de las muestras dentro de los tubos de microcentrífuga se les agregó 1 ml de xilol, cerrando la tapa y utilizando el vórtex durante un minuto para que se mezcle bien la muestra con el reactivo, después se centrifugo a 14,000 rpm durante dos minutos, el procedimiento de extracción de DNA se recomienda se haga en temperatura ambiente de 15°C a 25°C, pero no mayor a los 25°C debido a que puede verse afectado el procedimiento. Al extraer las muestras de la microcentrífuga, las muestras se trabajan siempre dentro de la campana y a cada una se le elimino el sobrenadante de xilol evitando el retiro de pellet, y se le agrego 1 ml de etanol para poder mezclarse mediante el vórtex durante un minuto, al terminar este paso, las muestras se centrifugaron nuevamente durante dos minutos a 14,000 rpm. De nuevo a las muestras se les retirar el sobrenadante de etanol evitando retirar el pellet, se utilizó pipetas con punta fina para poder retirar los sobrenadantes, seguido de esto las muestras se incubaron a una temperatura de 37°C durante 20 minutos, este paso permito en las muestras que los reactivos de material de xilol o etanol se puedan evaporar por completo.

Al pasar los 20 minutos las muestras pasaron a resuspenderse con 180 μl del tampón ATL, y 20 μl de proteinasa K y se mezcló con ayuda del vórtex durante dos minutos,

Posteriormente se procedió a incubarse a una temperatura de 56°C durante una hora, al finalizar este tiempo, nuevamente se incubaron a una temperatura de 90°C durante una hora más, en este paso las muestras deben de estar cerrada para evitar que se evaporara la reacción por completo.

Posteriormente a las dos horas de incubación de las muestras, fueron centrifugadas durante dos minutos a 14,000 rpm para poder eliminar las gotas que se encontraban dentro de los tubos, posteriormente se agregaron 200 µl de tampón AL a las muestras y se mezclaron mediante un vórtex durante 10 segundos, seguidamente fueron añadidos 200 µl de etanol y se mezclaron nuevamente durante 10 segundos, posteriormente a cada una de las muestras, se mezclaron durante un minuto más para asegurar que los sedimentos se mezclaran correctamente. De acuerdo con el protocolo que describe el fabricante se menciona que es fundamental que el tampón AL y etanol se mezclen de forma inmediata para poder obtener una solución homogénea. Al terminar de agregar el tampón AL y el etanol las muestras fueron centrifugadas durante dos minutos a 14000 rpm.

Inmediatamente se utilizaron las columnas MinElute que son proporcionadas dentro del kit, y el contenido se transfirió a cada una de las columnas correspondientes evitando mojar el borde, y a continuación las columnas fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante dos minutos para que el lisado pudiera transferirse adecuadamente. Al finalizar, la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección limpio y el tubo de recolección que se utilizó anteriormente se desecha, en caso de que el lisado no ha atravesado por completo la membrana de las columnas se debe de volver a centrifugar a 14,000m durante al menos 2 o 3 minutos, o hasta que se haya transferido por completo.

Teniendo la columna en el nuevo tubo recolector se debe de abrir con cuidado la tapa y se agregaron 500 µl de tampón AW1, evitando mojar el borde, cerrando la tapa pasan a centrifugarse durante 2 minutos a 14,000 rpm, al terminar la columna debe de colocarse nuevamente en un tubo recolector limpio desechando el anterior que contiene el flujo, y se agregaron 500 µl del tampón AW2, para pasar a centrifugarse de igual manera a 14,000 rpm durante dos minutos. Al finalizar la columna por vez consecutiva debe de repetir el paso de colocarla nuevamente en un tubo de recolección limpio, desechando el anterior y volviendo a centrifugar a 14,000 rpm durante tres minutos, esto le permitió el secado

completo de la membrana. Seguidamente la columna se colocó en un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 ml o 2 ml y se agregó 75 µl de tampón ATE en el centro de la membrana, se cerró y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante cinco minutos, por último, se centrifugo durante tres minutos a una velocidad de 14,000 rpm y al finalizar, se retiró la columna del tubo de microcentrífuga, se cierra el tubo y esta muestra de extracción de DNA se conservó en un congelador a una temperatura de -20°C. hasta su uso.

Extracción de DNA a partir de muestras sanguíneas

Para las muestras sanguíneas se utilizó el kit comercial DNeasy Blood & Tissue siguiendo el protocolo del fabricante, sin embargo, para este procedimiento algunos de los tiempos establecidos fueron modificados con la intención de obtener resultados mayormente favorables.

De acuerdo con las instrucciones este material debe de encontrarse a una temperatura entre 2°C a 8°C, estas condiciones permiten un buen funcionamiento, para poder ser utilizados incluso durante un año.

Las muestras recolectadas se conservaron en tubos con EDTA y se transportaron en hieleras al laboratorio para poder ser procesadas dentro de la campana de seguridad. Se trabajó a temperatura ambiente entre los 15-25°C. Para realizar este procedimiento se utilizó el protocolo de seguimiento para sangre con eritrocitos no nucleados con el paso 1^a, debido a que la sangre de mamíferos contiene eritrocitos no nucleados, mientras que la sangre de animales como los pájaros, peces o ranas contiene los eritrocitos nucleados.

Para proceder con el protocolo de extracción de DNA de las muestras sanguíneas se colocó dentro de los tubos de microcentrífuga de 1.5 ml, 100 µl de sangre con anticoagulante, se necesita un volumen específico que debe de ser calculado y estandarizado por el investigador para proceder con el protocolo. El volumen se ajustó agregando a cada una de las muestras 20 µl de Proteinasa K, 100 µl de PBS al 7.2%, para obtener un volumen final de 220 µl, seguidamente se agregaron 200 µl de tampón AL y la muestra paso a mezclarse con ayuda del vórtex durante un minuto para poder obtener una solución homogénea, posteriormente se incubó a una temperatura de 56°C durante 10 minutos.

Al pasar el tiempo establecido se agregaron a la muestra 200 µl de etanol al 96-100% y se mezcló mediante el vórtex durante un minuto, al terminar, el contenido de la muestra se transfirió a una de las columnas MiniSpin que son proporcionadas dentro del kit de extracción y se pasó a centrifugarse a 14,000 rpm durante tres minutos. Al finalizar la columna se colocó en un nuevo tubo de recolección y se desechó el anterior que contiene el flujo, y se le agregó a las muestras 500 µl de tampón AW1 y se centrifugó durante tres minutos a 14,000rpm, al terminar la columna nuevamente debe de ser colocada en un nuevo tubo de recolección limpio para se le agregó 500 µl de tampón AW2 y nuevamente se centrifugó por espacio de tres minutos a 14,000 rpm.

En comparación con el kit QIAamp DNA FFPE Tissue en esta ocasión, las columnas solamente se utilizan tres tubos de recolección nuevos.

Al terminar el último paso de centrifugación de las muestras, las columnas se colocaron en los tubos de microcentrífuga de 1.5 ml y se agregaron 100 µl del tampón AE directamente sobre la membrana evitando mojar el borde, y se dejaron en reposo durante cinco minutos a temperatura ambiente de entre 15°C a 25°C y posteriormente pasaron a centrifugarse durante tres minutos a una velocidad de 14,000 rpm para permitir la elución.

Debe de tomarse en consideración que la elución con 100 µl en lugar de 200 µl puede aumentar la concentración final del DNA, sin embargo, también puede provocar la disminución del rendimiento del DNA, para este procedimiento se optó por repetir este último paso de elución para poder obtener un mayor rendimiento general del DNA, por lo que se agregaron nuevamente 100 µl de tampón AE, dejando las muestras en reposo, pero en esta ocasión variando el tiempo, siendo solamente de un minuto. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm durante tres minutos.

Las muestras que contienen la extracción del DNA fueron conservadas en congelación con una temperatura de -20°C.

Cuantificación de ácidos nucleicos

Para obtener la concentración de DNA de cada una de las muestras procesadas se utilizó el espectrofotómetro para microplacas Epoch de Biotek, el cual es controlado a través del software Gen5. Para la cuantificación de ácidos nucleicos de las muestras se utilizó una

alícuota de 1 µl, junto con el último buffer que corresponde al de elución de cada uno de los kits, en el caso de las muestras incluidas en los cubos de parafina y las muestras de tejido incluidas en formalina donde se utilizó el kit QIAamp DNA FPPE Tissue se colocó el buffer ATE, mientras que para las muestras sanguíneas con el kit DNeasy Blood & Tissue se coloca el tampón AE.

De cada una de las muestras se colocaron 2.2 µl en cada uno de los pocillos disponibles. En total se dio lectura a 20 muestras de tejidos incluidas en cubos de parafina, 16 muestras de tejido incluidas en formalina, y 21 muestras sanguíneas. Los resultados obtenidos se muestran en el anexo 1. Al igual que la calidad que contiene cada una de las muestras.

Detección de regiones específicas en linfoma canino mediante PCR punto final

Para determinar la presencia de las secuencias genéticas de linfoma canino se utilizó la técnica molecular PCR en punto final.

Primers

Los primers que se utilizaron para este proyecto de investigación fueron tomados de literatura revisada de acuerdo con la investigación relacionada a diversas técnicas de detección de linfoma canino. (Burnett RC et al. 2003). (Tamura K, et al. 2006). (Yagihara H, et al. 2007). (Gentilini F, et al. 2009). (Chaubert P, et al. 2010). Se contaron con 5 juegos de primers, para la detección de diversas regiones que se describen a continuación.

Los juegos de primers que fueron utilizados corresponden al primer uno con el cuatro, primer tres con el primer dos, primer cinco con el primer seis, primer siete con el primer ocho, y el primer nueve con el primer diez.

Primer 1. Forward. Corresponde al fluorocromo de coloración amarilla. La secuencia a la que corresponde es: 5'-Hex- GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT. 20 µM (20 pmol/µl) requiere un volumen de 218 µl. Las alícuotas corresponden a 218/20 µl: 11 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 71.3°C .

Primer 4. Reverse que corresponde a la secuencia: 5' - TGAGGACACGAAGAGTGAGG. 20 µM (20 pmol/µl) requiere un volumen de 250 µl. Las alícuotas corresponden a: 13

tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 63.6°C .

Primer 3. Forward. Corresponde al fluorocromo de coloración naranja. La secuencia a la que corresponde es: 5'-ROX-GCCTCTGGATTACCTTCAG. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 259 μl . Las alícuotas corresponden a 259/20 μl : 13 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 65.9°C .

Primer 2. Reverse que corresponde a la secuencia: 5'-TGAGGAGACGGTGACCAGGGT. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 250 μl . Las alícuotas corresponden a: 13 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 71.6°C .

Primer 5 Forward. Corresponde al fluorocromo de coloración verde. La secuencia a la que corresponde es: 5'-6FAM-GGCGTGTA TACTGCGCTGCC. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 243 μl . Las alícuotas corresponden a 243/20 μl : 13 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 72.1°C .

Primer 6. Reverse que corresponde a la secuencia: 5'-TGTGCCAGGACCAADYACTTT. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 650 μl . Las alícuotas corresponden a: 33 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 64.9°C .

Primer 7. Forward. Corresponde al fluorocromo de coloración rojo. La secuencia a la que corresponde es: 5'-Cy5-CCATGTAYTACTGTGCCTGCTGG. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 221 μl . Las alícuotas corresponden a 221/20 μl : 12 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 69.1°C .

Primer 8. Reverse que corresponde a la secuencia: 5'-TACCTTCTGTAAATATCTTGATC. 20 μM (20 pmol/ μl) requiere un volumen de 250 μl . Las alícuotas corresponden a: 13 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 54.3°C .

Primer 9. Forward. Corresponde al fluorocromo de coloración carmesí. La secuencia a la que corresponde es: 5'-LC705-TTCCCCCTCATCACCTGTGA. 20 μM (20 pmol/ μl)

requiere un volumen de 273 μ l. Las alícuotas corresponden a 273/20 μ l: 14 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 67.9°C .

Primer 10. Reverse que corresponde a la secuencia: 5'-GGTTGTTGATTGCACTGAGG. 20 μ M (20 pmol/ μ l) requiere un volumen de 250 μ l. Las alícuotas corresponden a: 13 tubos correspondientes. La temperatura de alineación es de $\leq 72^{\circ}\text{C}$, o promedio de 64.2°C .

Tabla 3.- Primer utilizados en la estandarización de la técnica y su región específica en TCR y BCR...

Regiones específicas que detectan los juegos de primers			
Nº de primer	Región específica	Secuencia	pb
1	IgH V FWR1	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCT	309-378
4	IgH J3	TGAGGACACGAAGAGTGAGG	
3	IgH V FWR1	GCCTCTGGATTACCTTCAG	262-315
2	IgH J1-2	TGAGGAGACGGTGACCAGGGT	
5	TCR γ V2&6	GGCGTGTACTACTGCGCTGCC.	55-82
6	TCR γ Jx-2	TGTGCCAGGACCAADYACTTT	
7	TCR γ V3&5&7	CCATGTAYTACTGTGCCTGCTGG	55-82
8	TCR γ Jx-1	TACCTTCTGTAAATATCTTGATC	
9	IgM región constante	TTCCCCCTCATCACCTGTGA	128
10	IgM región constante	GGTTGTTGATTGCACTGAGG	

PCR punto final

Para la preparación de cada uno de los tubos de PCR, se utilizó el kit MP Taq-&GOTM Mastermix, se obtuvo un volumen total de 50 μ l, por lo tanto se utilizó de la Taq-&GO (5XC) Mastermix 10 μ l, de la plantilla de DNA 100pg a 100 ng según sea su origen, y se utilizaron de cada uno de los primers 20 pmoles. El PCR se preparó utilizando 10 μ l de máster mix, de DNA dependiendo de la concentración que se tenía en cada una de las muestras, de cada primer 2.5 μ l y de H2O MiliQ, dependiendo del volumen faltante de cada una de las muestras para completar el volumen requerido. Ver tabla 4. El protocolo se realizó en base a las condiciones del fabricante con algunas modificaciones. ver anexo 2. Se trabajó dentro de la campana de bioseguridad para evitar la contaminación de las

muestras a preparar, así como también de los reactivos. El kit se conservó en congelación a una temperatura de -20°C.

Tabla 4.- Cantidades de concentración en μl correspondiente a cada una de las muestras que se utilizaron en la Técnica de PCR para la estandarización en las diferentes muestras

Muestra	Máster mix (μl)	DNA (μl)	Primer (μl)	Primer (μl)	H2O MiliQ (μl)
M1	10	.25	2.5	2.5	34.75
M2	10	.20	2.5	2.5	34.8
M3	10	.30	2.5	2.5	34.7
M4	10	.24	2.5	2.5	34.76
M5	10	1.24	2.5	2.5	33.76
M6	10	.94	2.5	2.5	34.06
M7	10	1.50	2.5	2.5	33.5
M8	10	1.70	2.5	2.5	33.3
M9	10	1.07	2.5	2.5	33.93
M10	10	1.02	2.5	2.5	33.98
M11	10	.95	2.5	2.5	34.05
M12	10	1.46	2.5	2.5	33.54
M13	10	.63	2.5	2.5	34.37
M14	10	1.02	2.5	2.5	33.98
M15	10	.65	2.5	2.5	34.35
M16	10	.33	2.5	2.5	34.69
M17	10	.25	2.5	2.5	34.75
M18	10	.29	2.5	2.5	34.71
M19	10	.74	2.5	2.5	34.26
M20	10	3.13	2.5	2.5	34.75

Condiciones del termociclador para PCR punto final

Las condiciones del termociclador fueron variando a lo largo del estudio, se utilizaron diferentes gradientes de temperatura para el proceso de alineación, así como también diferentes números de ciclos. Dentro de las temperaturas de alineación la temperatura

estuvo variando entre uno a tres grados de temperatura, mientras que para los ciclos se realizaron variaciones de entre uno a cinco ciclos.

Resultados

Los resultados obtenidos a partir de cada una de las variaciones de temperatura y ciclos dentro del termociclador fueron analizados determinándose como las condiciones óptimas: Precalentamiento de las muestras a 105°C, para el proceso de desnaturalización 95°C durante 5 segundos por un ciclo, la desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, por 40 ciclos, y una elongación final de 72°C durante 1 minuto 30 segundos por un ciclo. El tiempo total que se lleva a cabo durante este procedimiento es de 2 horas dentro del termociclador.

La estandarización de la técnica molecular fue realizada con las muestras incluidas en cubos de parafina. Se trabajó con 20 muestras las cuales se solicitaron a diferentes clínicas veterinarias enfocadas en la oncología veterinaria, estas muestras se derivaron de pacientes caninos con diagnóstico de esta neoplasia determinada mediante la técnica de histopatología.

Por otro lado, las muestras en formalina y las muestras sanguíneas correspondieron a muestras recolectadas de pacientes que se presentaron a las diversas clínicas veterinarias con alguna signología de presentar esta neoplasia, sin embargo, no se obtenía un diagnóstico final para estas mismas.

A continuación, se observan solo algunas de las fotografías de los geles realizados, sin embargo, se consideró importante mostrar los resultados finales para cada uno de los juegos de primers en las distintas muestras obtenidas, por lo que se colocaron fotografías relevantes para cada juego de primers en las muestras incluidas en cubos de parafina, muestras en formalina y muestras sanguíneas.

El carril que se encuentra marcado con las iniciales PM corresponde al carril que contiene el marcador de peso molecular de 25 a 500 pares de bases BIO BASIC.

Se optó por elegir este marcador de peso molecular debido a que nuestros productos de PCR amplifican fragmentos dentro del rango de los 55 a 378 pares de bases. Las iniciales PM en cada una de las fotografías corresponden al marcador de peso molecular, y la (N) en el noveno carril corresponde al negativo que fue utilizado. El negativo que se utilizó corresponde a H₂O MQ, GelRed, y Azul de bromofenol.

Se utilizó agarosa al 2 % y cada uno de los geles se sometieron a 80 voltios durante 80 minutos. Esto nos permitió tener una buena visualización de cada uno de nuestros resultados.

Muestras incluidas en cubos de parafina

En la figura 6 del carril número uno al carril número cinco, corresponden al juego de primers uno y cuatro que en caso de ser positivos deben de marcar una banda para un numero de pares de bases de 309 a 378 pares de bases y correspondería a un caso positivo de un linfoma de células B, sin embargo, como se puede observar en la figura no se observa ninguna banda, por lo que el resultado para estas muestras en este juego de primers se considera negativo. Del carril número seis al carril número ocho, se utilizó otro juego de primers que corresponden al juego tres y dos que permiten la detección de un resultado positivo al encontrarse una banda en un rango entre los 262 a 315 pares de bases y corresponden de igual manera para un linfoma de células B, sin embargo, tampoco se observó ninguna banda dentro de este rango mencionado por lo que las muestras para este juego de primers también se consideraron negativas. Estos primers fueron utilizados para las 20 muestras con las cuales se estandarizo la técnica y ninguna de ellas resulto positiva para estos dos juegos de primers.

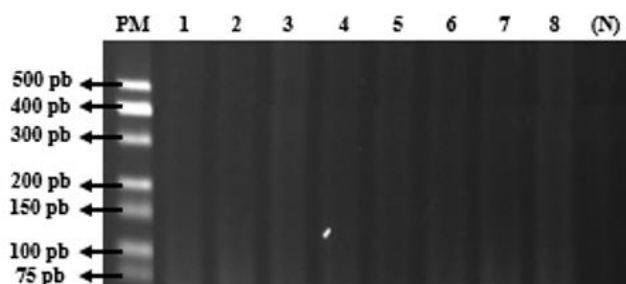


Figura 6.-. Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando el Juego de primers 1 & 4 y juego de primers 3 & 2.

Los juegos de primers que fueron utilizados para estas muestras corresponden a los juegos cinco y seis, siete y ocho. A partir del carril número uno al carril número cinco fueron utilizados el juego de primers cinco y seis que permite la detección de la presencia de un linfoma al presentarse una banda marcada en un rango que va entre los 55 a 82 pares de

bases, por lo que al observarse esta banda en estas muestras los resultaron se consideraron positivos (ver figura 7). Por otro lado, del carril número seis al carril número ocho se utilizó el juego de primers siete y ocho, que permiten la detección positiva al marcarse un número de pares de bases que va desde los 55 a los 82 y como se puede observar en la figura, las bandas se encuentran dentro del rango de pares de bases esperado.

De las 20 muestras que se obtuvieron en los cubos incluidos en parafina solamente cinco de ellas resultaron ser positivas para el juego de primers cinco y seis, que determinan una región específica del linfoma de células T, y dentro de estas cinco muestras, tres de ellas también resultaron ser positivas para otra región específica de linfoma de células T que corresponden al juego de primers siete y ocho.

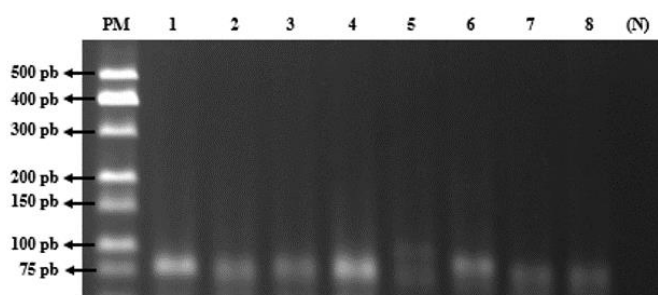


Figura 7.- Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando Juego de primers 5 & 6 y juego de primers 7 & 8.

En la figura 8.- se puede observar que en el carril número uno al carril número cuatro se colocaron muestras que corresponden al juego de primers cinco y seis, estas son algunas de las muestras que se mostraron con anterioridad y que resultaron ser positivas para estos juegos de primers clasificando esta neoplasia como un linfoma de células T, mientras que a partir del carril número cinco al carril número ocho se pueden observar algunas de las muestras donde se colocaron el juego de primers nueve y diez, y como puede observarse en la figura se presentan unas bandas marcadas en los 128 pares de bases que corresponden a lo esperado para este juego de primers, por lo consiguiente estas muestras fueron consideradas como positivas, en este caso este juego de primers permite la detección de un linfoma canino de células B, dentro de las 20 muestras que fueron recolectadas 15 de ellas resultaron positivas para este juego de primers debido a que se encontraba la banda en el número de pares de bases que corresponde.

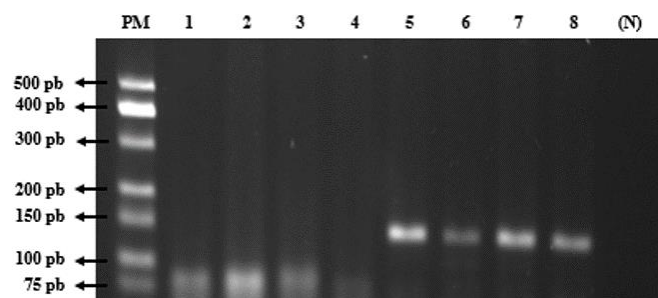


Figura 8.- Muestras incluidas en cubos de parafina utilizando Juego de primers 9 & 10.

Muestras en formalina

En la figura 9 se observarse que a partir del carril número uno al carril numero dos se colocaron algunas de las muestras que arrojaron un resultado negativo para la presencia de linfoma canino para el juego de primers uno y cuatro, donde en caso de ser positivo se esperaría una banda marcada en un rango de pares de bases de 309 a 380. Del carril número tres al carril número cuatro se encuentran muestras con el juego de primers tres y dos, donde de la misma manera se puede observar un resultado negativo, debido a que se encuentra ausente la banda que en caso se haber resultado positivo esta banda debería de encontrarse en un rango de 262 a 315 pares de bases. Por otro lado, en el carril cinco y seis se colocaron muestras con el juego de primers cinco y seis donde se obtuvo una banda como resultado positivo para linfoma canino, debido a que se observa una banda dentro del rango de pares de bases esperado para permitir la detección positiva, sientos los pares de bases entre los 55 a 82. En los carriles siete y ocho se encuentran muestras con el juego de primers siete y ocho, que corresponden a 55 a 82 pares de bases para poder permitir la detección positiva de linfoma canino, en el carril número siete al no observarse ninguna banda en el rango esperado para este juego de primers el resultado se consideró como negativo para esta muestra, mientras que para el carril número ocho el resultado fue positivo al observarse una banda dentro del número de pares de bases esperado. Los juegos de primers cinco y seis, y siete y ocho corresponden para la detección de un linfoma canino de células T.

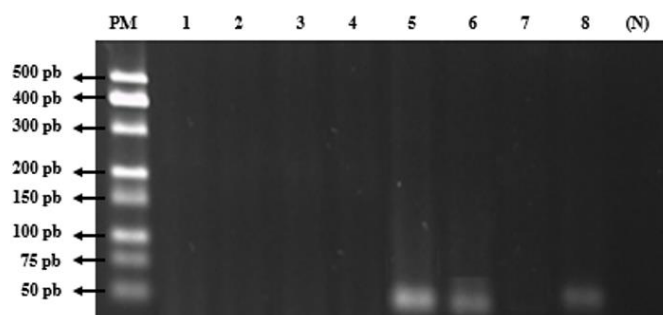


Figura 9.- Muestras en formalina utilizando Juego de primers 1 & 4, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.

En las siguientes muestras de tejido en formalina a partir del carril número uno al carril número tres se colocaron muestras con el juego de primers nueve y diez, en el carril número dos el resultado se consideró como negativo debido a que no se observó ninguna banda marcada en el número de pares de bases esperado, mientras que la muestra del carril número uno y número tres se consideraron como positivas a un linfoma de células B, de acuerdo con este juego de primers, donde se observa una banda marcada en los 128 pares de bases (ver figura 10). Por otro lado, en el carril número cuatro se observa una de las muestras con resultado positivo para el juego de primers tres y dos, donde se puede observar una banda dentro del rango de pares de bases esperadas, para considerar positivo la banda debe de encontrarse dentro del rango de 262 a 315 pares de bases, por lo que esta muestra se consideró como positiva a un linfoma de células B. En el carril número cinco, se observa una banda marcada en una de las muestras correspondientes al juego de primers cinco y seis que se consideró positiva por encontrarse en el rango de pares de bases esperadas siendo de 55 a 82, y este corresponde a ser un linfoma de células T. En el carril número seis se colocó una muestra con el juego de primers siete y ocho, donde se observa una banda entre los 55 a 82 pares de bases que son los correspondientes para este juego de primers, por lo que la muestra se consideró como positiva para un linfoma de células T. Por otro lado, en los carriles siete y ocho se colocaron dos muestras con el juego de primers nueve y diez, donde se espera tener 128 pares de bases para considerarse como muestra positiva, por lo que al observarse las bandas presentes en este rango esperando las muestras se consideraron positivas para un linfoma de células B.

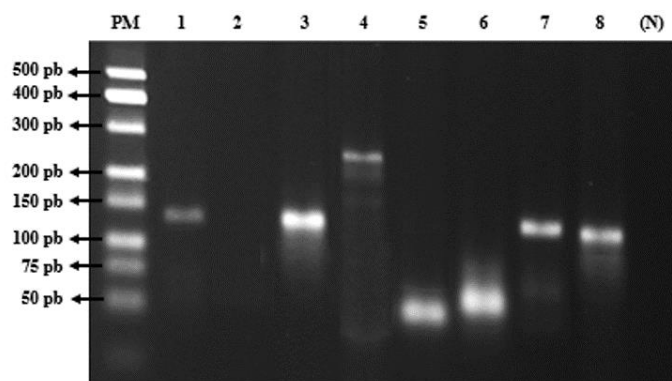


Figura 10. Muestras en formalina utilizando Juego de primers 9 & 10, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.

En la figura 11 se pueden apreciar algunos de los resultados restantes para estas muestras en formalina. En el carril número uno, cuatro y siete corresponden a muestras con el juego de primers siete y ocho, en los carriles dos, cinco y ocho se colocaron muestras con el juego de primers nueve y diez, mientras que en los carriles tres y seis se colocaron muestras con el juego de primers cinco y seis. Como se puede observar en la figura en cada uno de los carriles se obtuvo una banda que permitió considerar a cada una de estas muestras como positivas para su respectivo juego de primers. El juego de primers cinco y seis, y el siete y ocho corresponden a un linfoma de células T, mientras que el juego de primers nueve y diez corresponden a un linfoma de células B.

Para las muestras de tejido en formalina se obtuvo un total de 16 muestras que fueron recolectadas como se mencionó anteriormente de diversos lugares enfocados a la oncología veterinaria como lo son asociaciones y clínicas veterinarias. Dentro de estas 16 muestras para el juego de primers uno y cuatro ninguna de las muestras resultó ser positiva, para el juego de primers nueve y diez, ocho de estas 16 muestras resultaron positivas, y estos corresponden a linfomas caninos de células B, por otro lado, dentro de estas ocho muestras cuatro de ellas resultaron ser positivas también para otro juego de primers, siendo este el juego tres y dos, que permiten la detección de otra región específica del linfoma de células B. De las ocho muestras restantes de tejido en formalina, se pudo determinar en base a los resultados que estas ocho muestras corresponden a linfomas caninos de células T, debido a que se observaron las bandas correspondientes para el juego de primers cinco y seis, y dentro de estas ocho muestras, cuatro de ellas resultaron ser positivas para otro juego de primers que son el juego siete y ocho.

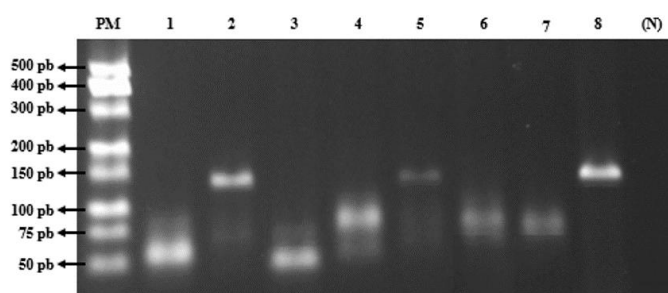


Figura 11.- Muestras en formalina utilizando juego de primers 9 & 10, 3 & 2, 5 & 6, 7 & 8.

Muestras Sanguíneas

En la figura 12 se colocaron las muestras sanguíneas con los distintos juegos de primers uno y cuatro, y tres y dos. A partir del carril número uno al número cuatro se colocaron muestras con el juego de primers uno y cuatro, mientras que en los carriles cinco, seis, siete y ocho se colocaron muestras con el juego de primers tres y dos. Para el juego de primers uno y cuatro los pares de bases esperados en caso se obtener un resultado positivo debe de encontrarse una banda entre los 309 a 318 pares de bases, mientras que para el juego de primers tres y dos de 262 a 315 pares de bases. Como se puede observar en la figura, no se encontró ninguna banda dentro del rango esperado de pares de bases para poder determinar la muestra como positiva, por lo que al estar las bandas ausentes en estos juegos de primers, los resultados para estas muestras se consideraron negativas para determinar la presencia de un linfoma de células B.

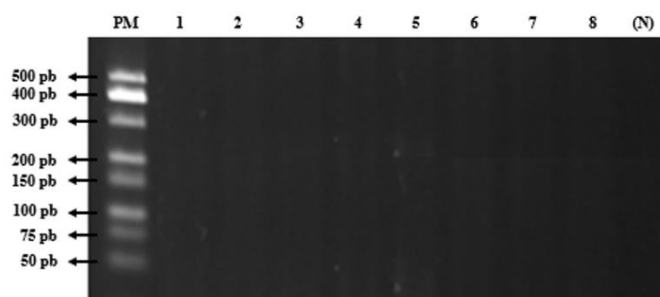


Figura 12.- Muestras sanguíneas con juego de primers 1 & 4 y 3 & 2.

En la figura 13 se observan los resultados que se obtuvieron con las muestras sanguíneas, utilizando los distintos juegos de primers cinco y seis, y siete y ocho. El carril número

uno, dos, tres y cuatro corresponden a muestras con el juego de primers cinco y seis, mientras que los carriles cinco, seis, siete y ocho corresponden a muestras con el juego de primers siete y ocho. Para ambos juegos de primers los pares de bases esperados para permitir una correcta determinación de la presencia y desarrollo de un linfoma canino son de 55 a 82 pares de bases, y como se puede observar en la figura, en cada uno de los carriles donde se colocaron las muestras se puede apreciar una banda dentro del rango esperado de pares de bases para considerarse como muestras positivas. Por consiguiente, al ser positivas, estas muestras se clasificaron como linfomas caninos de células T.

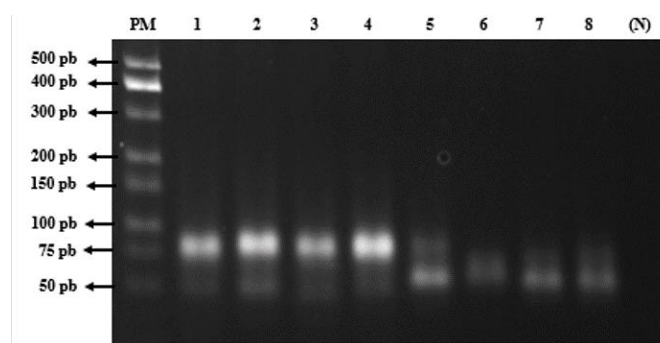


Figura 13.- Muestras de sangre con juego de primers 5 & 6 y 7 & 8.

En la figura 14 se colocaron algunas de las muestras con el juego de primers nueve y diez, y como se puede observar ninguna de ellas presento una banda, en caso de que la muestra se hubiese mostrado positiva esta banda debería de localizarse entre los 128 pares de bases. Sin embargo, al no observarse ninguna banda en ninguno de los carriles, estas muestras se consideraron negativas para este juego de primers y por lo tanto negativas a un linfoma de células B.

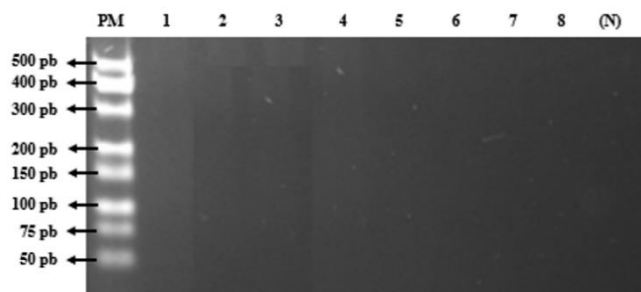


Figura 14. Muestras sanguíneas con juego de primers 9 & 10.

En total se obtuvieron 21 muestras sanguíneas de diferentes pacientes que, por alguna signología, o análisis clínico se sospechó del desarrollo de esta neoplasia, sin embargo, no se tenía un diagnóstico definitivo, la muestras fueron recolectadas en tubos EDTA. Para el total de las 21 muestras se obtuvo como resultado que 16 de estas muestras corresponden a un linfoma de células T debido a que el resultado fue positivo al encontrarse bandas para el juego de primers cinco y seis, por otro lado, dentro de estas 16 muestras solamente cuatro de ellas resultando positivas para otro juego de primers que también indica otra región específica para un linfoma de células T, siendo este juego de primers el número siete y ocho, mientras que las cinco muestras restantes de las 21 en total resultaron ser negativas para todos los juegos de primers.

Tabla 5.- Total de muestras y el tipo de muestras utilizando los diferentes tipos de Primer

Total de muestras	Tipo de muestra	Juego de primers						
		1 & 4309-378pb	3 & 2 262-315pb	5 & 6 55-82pb	7 & 8 55-82pb	9 & 10 128pb	Resultado Nulo	
20	Tejido incluido en cubos de parafina	×	×	✓ 5 muestras positivas	✓ 3 muestras positivas	✓ 15 muestras positivas	×	
16	Tejidos incluidos en formalina	×	✓ 4 muestras positivas	✓ 8 muestras positivas	✓ 4 muestras positivas	✓ 8 muestras positivas	×	.
21	Muestras sanguíneas	×	×	✓ 16 muestras positivas	✓ 4 muestras positivas	×	✓ 5 muestras nulas	

Discusión

Cuando el diagnóstico histopatológico rutinario no permite el diagnóstico diferencial entre linfoma y otra enfermedad linfoproliferativa, existen otras modalidades diagnósticas que se están utilizando. Entre ellas se encuentra el inmunofenotipaje, mediante la expresión de los marcadores CD3 y CD20, entre otros, que permiten identificar el linaje del infiltrado celular. Esta técnica está estudiada fundamentalmente en la especie felina y hoy en la canina (Waly NE, et al. 2005; Pohlman LM, et al. 2009; Washabau RJ, et al. 2010; Kiupel et al. 2011; Briscoe KA, et al. 2011). Este estudio tuvo como principal objetivo implementar el desarrollo de una técnica molecular PCR punto final como método de detección para un linfoma canino y permitir la clasificación de este, siendo un linfoma de células B (BCR región V, J) o un linfoma de células T. para identificar la reorganización del gen para la cadena del receptor de células T (TCR región V, J) y así esta técnica, se ha aplicado con el fin de hacer una diferenciación entre linfoma T o linfoma B además de descartar si se trata de una enfermedad linfoproliferativa (leucemia). Algunos autores han sugerido que se realicen pruebas más específicas y rápidas para poder diferenciar los tipos de linfoma, además, de los estudios que se mencionan de la histopatología y de inmunofenotipaje (Moore PF, et al. 2005; Kiupel, et al. 2011 y Fukushima K, et al. 2009; Takanosu M, et al. 2010). Los resultados que se obtuvieron fueron considerados favorables implementando esta técnica por lo que se busca que en el futuro pueda agregarse esta técnica como un método de diagnóstico de uso rutinario en clínicas veterinarias. En este trabajo se propuso realizar un test mediante la técnica molecular de PCR para diferenciar la clonalidad linfocitaria, este experimento se realizó basándose en estudios previos descritos en la literatura modificando algunos factores importantes para los resultados finales, entre los cuales se sometieron cambios en las temperaturas, así como también los ciclos necesarios para una correcta estandarización de la técnica PCR punto final. Los cambios que se realizaron permitieron que se obtuvieran resultados viables en casi la mayoría de las muestras. Para este estudio se utilizaron cinco diferentes juegos de primers que permitieron la detección de regiones monoclonales (IgH V, IgH J3, IgH J1-2, TCR γ V2&6, TCR γ J α -2, TCR γ V3&5&7, TCR γ J α -1) que se presentan en el desarrollo de linfoma canino, se obtuvieron dos juegos de primers para la detección de un linfoma de células T y tres para la detección de un linfoma de células B. El linfoma canino puede

tener diversos diagnósticos diferenciales debido a la forma en que se desarrolla y no permite identificar fácilmente que se trate de una neoplasia en curso, además que el tiempo de desarrollo en ciertos casos no se presenta de una manera radical, por lo que los resultados obtenidos en este estudio se consideran favorables para la detección de esta neoplasia en cuyos casos donde el diagnóstico de la presencia de la neoplasia no es tan avanzado.

Las muestras obtenidas incluidas en cubos de parafina se solicitaron a diversos laboratorios y clínicas enfocadas en la oncología veterinaria y se solicitaron muestras que tuvieran como diagnóstico definitivo la neoplasia de linfoma canino, estas muestras contaban con el diagnóstico final mediante pruebas de histopatología, por lo que se consideraron aptas para poder realizar la estandarización de la técnica para detectar el linfoma canino, sin embargo no se obtuvo el linaje al que fueron pertenecientes cada una de estas muestras. En el estudio se obtuvo un total de 20 muestras incluidas en cubos de parafina de las cuales 15 de ellas corresponden a un linfoma de células B y las 5 restantes corresponden a un linfoma de células T, estas 5 últimas muestras corresponden a un juego de primers que es el 5 y 6 sin embargo, también se tiene presente el desarrollo de otra forma monoclonal que permite ser detectada por otro juego de primers que son el 5 y 8, sin embargo esta región monoclonal solo está presente en 3 de las 5 muestras. Consideramos de interés el estudio de las muestras dentro de los grupos de Linfoma, pese a que pensamos que las muestras tenían solamente un reordenamiento genético similar entre ellas, por otro lado encontramos otras variaba de este reordenamiento lo cual no fueron positivos a los primers para la detección de ese reordenamiento, pero si a otros reordenamientos y esto nos parece interesante analizar las características que tienen en común, porque esto implica que cada tipo de linfoma que está presente en los canideos, presenta una diversidad en el reordenamiento monoclonal, esto demuestra que cada una de los linfomas son diferentes en su reordenamiento genético y que habría que tener en cuenta en futuros estudios.

Estos razonamientos coinciden con algunos autores donde hacen referencia que en algunos casos donde se encuentran procesos inflamatorios se acompañan en ocasiones de acúmulos focales de linfocitos intraepiteliales. En medicina veterinaria el “linfoma T tipo

enteropatía” ha sido poco estudiado, pero se ha sugerido que, en un estado inicial, el cambio neoplásico que puede estar presente sólo en células aisladas, siendo una enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) epiteliotrópico (Vail D & Thamm DH, 2007). En medicina humana incluso el diagnóstico de la enfermedad celíaca (EC) refractaria se basa en la exclusión de otros trastornos, La detección de alteraciones en la población de linfocitos intraepiteliales es crucial para el diagnóstico y tratamiento porque puede desarrollar complicaciones graves, como linfoma de células T asociado a enteropatía en los que los linfocitos intraepiteliales muestran características de malignidad, pero aún no puede detectarse la presencia de linfoma (Swerdlow SH, et al. 2008; Burke, et al. 2011; Busto, et al. 2011).

Por otro lado, fueron recolectadas muestras de pacientes que tenían un posible diagnóstico diferencial de linfoma canino, sin embargo, no se tenía como diagnóstico final en algunos casos, de estos pacientes se recolectaron muestras de tejido incluidos en formalina y muestras sanguíneas. Para las muestras de tejido incluidas en formalina se obtuvo un total de 16 muestras de las cuales solo se tuvo confirmación de 11 de ellas que el diagnóstico final, fue linfoma canino, y de igual manera se desconoce el linaje al que pertenecen, sin embargo, en el estudio realizado se obtuvo como resultado final que de estas 16 muestras 8 correspondían a un linfoma de células B y 8 correspondían a un linfoma de células T, de las 8 muestras correspondientes a linfoma de células B, 4 de ellas también son positivas para detectar un nuevo reordenamiento monoclonal que es detectado por el juego de primers 3 y 2, mientras que dentro de las 8 muestras correspondientes a un linfoma de células T se encontraron 4 muestras positivas a un nuevo reordenamiento que permite ser detectado por el juego de primers 7 y 8. Por otro lado, en las muestras sanguíneas se obtuvo un total de 21 muestras, de las cuales 16 pertenecen a un linfoma de células T que fueron detectadas positivas con el juego de primers 5 y 6 y solamente 4 de ellas presentaron un nuevo reordenamiento clonal detectado por el juego de primers 7 y 8, las 5 muestras restantes se consideraron negativas debido a que no se pudo observar ninguna banda de amplificación para ninguno de los 5 juegos de primers que fueron utilizados en este estudio. Cada una de las muestras fue sometida a verificación por triplicado y en los 3 análisis el resultado tuvo concordancia con el primer y segundo resultado.

En el estudio realizados por Olivero y colaboradores (2011) en enfermedad inflamatoria crónica intestinal (IBD) canino, sólo 1 de 47 casos resulta monoclonal para el receptor de linfocitos T, y coincide con que no presenta respuesta al tratamiento tras el seguimiento clínico, de manera que los propios autores proponen que se trate de un linfoma incipiente, difícil de detectar en un diagnóstico puramente morfológico. Los resultados de este último estudio reiteran la necesidad de tomar la técnica molecular de PCR, como técnica confirmatoria del linaje y no como el diagnóstico morfológico, a pese a ser muy rara la aparición de falsos positivos o de poblaciones clónales que no correspondan con procesos neoplásicos.

De acuerdo con los resultados finales que se obtuvieron a través de la técnica se pudo concordar con diversos autores como (Raulet DH, 1989, Rezuze WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ, 1996). en que posteriormente a la recombinación somática que ocurre con cada uno de los segmentos V, D y J puede desarrollarse la inclusión de cierta cantidad de nucleótidos de manera aleatoria creando nuevos genes que contengan una amplia diversidad presente tanto en su secuencia como longitud.

En base a estos resultados se pudo deducir que el linfoma canino lograra tener un repertorio un poco limitado en cuanto a sus recombinaciones somáticas, sin embargo, no se descarta la posibilidad de que se presente el desarrollo de nuevos reordenamientos monoclonales que pudieran no llegar a ser detectados mediante esta técnica de diagnóstico, debido a que es un proceso que se da completamente al azar. Por lo que se concuerda con lo establecido por (Burnett, et al., 2003). en que un resultado negativo puede darse a que las muestras obtenidas pueden tener una recombinación distinta y no permite que los primers puedan unirse a la región específica que se busca debido a que está ausente y posiblemente se haya desarrollado alguna otra monoclonal, o simplemente no se trata de un linfoma canino, aunque esta última pudiera ser muy poco probable. Se piensa que pueden existir dos principales razones por las cuales no se reconoce adecuadamente esta neoplasia, la primera es que el tumor se pudo haber desarrollado de una manera monoclonal, sin embargo, pudo surgir alguna mutación más y esto llevo a la evolución de esta célula dando como resultado la producción de nuevos múltiples monoclonalidades. La segunda razón pudiera corresponder a la presentación de algunos

de los factores de riesgo como es la transformación de esta neoplasia debido a la exposición a agentes carcinógenos o incluso la expansión de nuevos múltiples clones debido a alguna transformación por algún virus.

Este estudio tenía anteriormente como un objetivo principal poder realizar una técnica PCR múltiple tanto en punto final como en tiempo real, y este experimento fue realizado, primero en PCR múltiple punto final para poder observar si los resultados obtenidos tenían concordancia con los arrojados en PCR punto final, se intentó estandarizar la técnica, sin embargo los resultados obtenidos en el PCR múltiple en punto final no fueron los deseados ya que fueron nulos, se consideró que esta técnica no pudo ser montada debido a que había empalme de bases o que quizás las temperaturas que se consideraron optimas por individual, no tenían el mismo resultado al realizarlas de manera múltiple. Se realizaron pruebas utilizando cuatro juegos de primers y tres juegos de primers con sus respectivas combinaciones sin embargo los resultados fueron nulos. Las combinaciones que se realizaron se hicieron evitando colocar el juego de primers cinco y seis, y siete y ocho para evitar el posible empalme de bases y evitar su competencia y que esto pudiera afectar con los resultados finales, sin embargo, aun realizando este movimiento no se obtuvieron

Conclusiones

- 1.- La técnica molecular PCR punto final que fue empleada en muestras de tejido incluidos en cubos de parafina, tejidos incluidos en formalina y muestras sanguíneas es de gran utilidad como un método de diagnóstico o método complementario de diagnóstico para la detección de linfoma canino.
- 2.- De acuerdo con los resultados obtenidos se puede concluir que en el linfoma canino existe una gran diversidad de recombinaciones somáticas que ocurren completamente al azar, sin embargo, una de las principales características que se presenta en esta neoplasia es la monoclonalidad resultante de esta recombinación somática, que pudo ser detectada por la mayoría de los juegos de primers que fueron utilizados en este experimento a excepción del juego de primers uno y cuatro que corresponden a las regiones IgH V, IgH J3.
- 3.- La mayoría de las muestras procesadas arrojaron resultados satisfactorios, obteniendo un total de 57 muestras de las cuales solamente 5 de ellas no se detectaron como linfoma canino de acuerdo con que el resultado fue nulo. Y esto se concluye a que puede deberse principalmente por la recombinación somática anteriormente mencionada, por lo cual este método de diagnóstico se considera altamente eficaz para la detección de esta neoplasia, así como también como método que permita su inmunofenotipificación. Sin embargo, debido a la gran diversidad tanto policlonal como monoclonal que se puede generar a través de cada uno de sus receptores específicos esta técnica pudiera no ser efectiva para todas las muestras obtenidas de pacientes sospechosos a linfoma debido a que en ciertos pacientes lograra desarrollarse una nueva monoclonalidad o una monoclonalidad que no se detecta con los juegos de primers que se utilizaron para este experimento.
- 4.- Por otro lado, los juegos de primers que se utilizaron no permitieron uno de los objetivos que pudiera tener alternativamente este experimento siendo una técnica PCR múltiple, debido a problemas que pudieran haberse dado en la estandarización en conjunto, pudiendo ser desde la temperatura, los ciclos o principalmente el empalme de las bases.

Bibliografia

- Adams V.J, Evans K.M, Sampson J, Wood J.L.N. 2010. Methods and mortality results of a health survey of purebred dogs in the UK. *Journal of Small Animal Practice*. 51: 512-524.
- Ahmedin Jemal, Ram C. Tiwari, Taylor Murray, Asma Ghafoor, Alicia Samuels, Elizabeth Ward, Eric J. Feuer, Michael J. Thun. 2004. *Cancer Statistics*. CA: a cancer journal for clinicals. 54: 8-29.
- Alessandra Gavazza, Silvano Presciuttini, Roberto Barale, George Lubas, Biancaurora Gugliucci. 2008. Association Between Canine Malignant Lymphoma, Living in Industrial Areas, and Use of Chemicals by Dog Owners. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 15(3) p 190-195.
- Ane Avery. 2009. Molecular Diagnostics of Hematologic Malignancies. *Topics in Companion Animal Medicine*. 24 (3): 144-150.
- Bebhinn Treanor. 2012. B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology*, 136 21-27.
- Biki B. Takashima-Uebelhoer, Lisa G. Barber, Sofija E. Zagarins, Elizabeth Procter-Gris, Audra L. Gollenberg, Antony S. Moore, Elizabeth R. Bertone-Johnson. 2012. Household chemical exposures and the risk of canine malignant lymphoma, a model for human non-Hodkin's lymphoma. *Environmental Research*. 112. 171-176.
- Blackwood L, Sullivan M, Lawson H. 1997. Radiographic abnormalities in canine multicentric lymphoma: a review of 84 cases, *Journal of Small Animal Practice* 38: 62–69.
- Briscoe K.A, Krockenberger M, Beatty J.A, Crowley A, Dennis M.M, Canfield P.J, Dhand N, Lingard A.E, Barrs V.R. 2011. Histopathological and Immunohistochemical Evaluation of 53 cases of Feline Lymphoplasmacytic Enteritis and Low-Grade Alimentary Lymphoma. *Journal of Comparative Pathology*, 145(2-3): 187-198.

- Bromberek JL, Derrota ED, Agnew MR, Yoshimoto J, Morley PS, Avery AC. 2016. Breed distribution and clinical characteristics of b cell chronic lymphocytic leukemia in dogs, *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30: 215–222.
- Burke JS. 2011. Lymphoproliferative disorders of the gastrointestinal tract: A review and pragmatic guide to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med.* 135: 1283-1297.
- Burnett RC, Vernau W, Modiano JF, Olver CS, Moore PF, Avery. 2003. Diagnosis of canine lymphoid neoplasia using clonal rearrangements of antigen receptor genes. *Veterinary Pathology* 40,32-41.
- Busto Bea V, Crespo Pérez, L. Rodríguez-Gandía MÁ, Roy Ariño G, García-Miralles N, Cano Ruiz A. 2011. Enteropathy-associated T-cell lymphoma: A diagnostic challenge. *Gastroenterol HEpatol* 34: 686-689.
- Carter RF, Valli VE, Lumsden JH. 1986. The cytology, histology and prevalence of cell types in canine lymphoma classified according to the National Cancer Institute Working Formulation, *Canadian Journal Veterinary Research.* 50: 154–164.
- Chan CM, Frimberger AE, Moore AS. 2018. Clinical outcome and prognosis of dogs with histopathological features consistent with epitheliotropic lymphoma: a retrospective study of 148 cases (2003-2015), *Veterinary Dermatology* 29: 154–159.
- Cosmas C. Giallourakis, Andrew Franklin, Chunguang Guo, Hwei-Ling Cheng, Hye Suk Yoon, Michael Gallagher, Thomas Perlot, Milena Andzelm, Andrew J. Murphy, Lynn E. Macdonald, George D. Yancopoulos, Federick W. Alt. 2010. Elements between the IgH variable (V) and diversity (D) clusters influence antisense transcription and lineage-specific V(D)J recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107(51) 22207-22212.
- Couto K.M, Moore P.F, Zwingenberger AL, Willcox JL, Skorupski KA. 2018. Clinical characteristics and outcome in dogs with a small cell T-cell intestinal lymphoma. *Veterinary and comparative oncology.* 16 (3) 337-343.

- Coyle K.A, Steinberg H. 2004. Characterization of Lymphocytes in Canine Gastrointestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology*. 41:141–146.
- Chaubert P, Baur Chaubert AS, Sattler U, Forster U, Bornand V, Suter M, Welle M. 2010. Improved polymerase chain reaction-based method to detect early-stage epitheliotropic T-cell lymphoma (mycosis fungoides) in formalin-fixed, paraffin-embedded skin biopsy specimens of the dog. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*. 22: 20-29.
- Dargent FJ, Fox LE, Anderson WI. 1988. Neoplastic angioendotheliomatosis in a dog: an angiotropic lymphoma, *The Cornell Veterinarian*. 78:253–262.
- Davis M. Seelig, Anne C. Avery, E.J. Ehrhart, Michael A. Linden. 2016. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma, *Veterinary Sciences* 3:11.
- Davis M. Seeling, Anne C. Avery, E.J. Ehrhart, Michael A. Linden. 2016. The comparative diagnostic features of canine and human lymphoma, *Veterinary Sciences* 3(2):11.
- Edwards DS, Henley, Harding EF, Dobson JM, Madera JLN. 2004. Breed Incidence of Lymphoma in a UK population of insured dogs. *Veterinary and comparative oncology*. 1(4). 200-206.
- Elsbeth M. Waugh, Alice Gallagher, Karen A. McAulay, Joaquim Henriques, Margarida Alves, Adam J. Bell, Joanna S. Morris, Ruth F. Jarret. 2015. Gammaherpesviruses and canine lymphoma: no evidence for direct involvement in commonly occurring lymphomas. *Journal of General Virology*. 96: 1863-1872.
- Emma Hooijberg, Liesl J. Van Rooyen Fred Reyers. 2018. Breed Prevalence of Canine Lymphoma in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*. Volume 89, No.1.
- Ernst T, Kessler M, Lautscham E, Willimzing L, Neiger R. 2016. Multicentric lymphoma in 411 dogs - an epidemiological study, *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere* 44:245–251.
- Evan T. Keller. 1992. Immune-mediated disease as a risk factor for canine lymphoma. *Cancer*. 70(9). 2334-2337.

- Ferreira de la Cuesta G, Pedraza F. Caracterización y análisis de las neoplasias registradas en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia durante 30 años (1968 – 1998). En: Ferreira de la Cuesta G. 2003. Patología Veterinaria. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia), 580- 581.
- Ferreira de la Cuesta G, Pedraza F. 2003. Caracterización y análisis de las neoplasias registradas en el Laboratorio de Patología Animal de la Universidad de Antioquia durante 30 años (1968 – 1998). En: Ferreira de la Cuesta G. Patología Veterinaria. Editorial Universidad de Antioquia, Medellín (Colombia), 580- 581.
- Fisher DJ, Naydan D, Werner LL, Moore PF. 1995. Immunophenotyping Lymphomas in Dogs: A comparison of results from fine needle aspirate and needle biopsy samples. *Veterinary Clinical Pathology*, 24(4) 118-123.
- Flood-Knapik K.E, Durham A.C, Gregor T.P, Sánchez M.D, Durney M.E, Sorenmo K.U. 2012. Clinical, histopathological and immunohistochemical characterization of canine indolent lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*, 11(4) 272-286.
- Flores, S. del Riego, H. 2012. Actualización de la terapia del paciente canino con linfoma. Update of the therapy of the canine patient with linfoma. Pp. 83- 84. *Hospitales veterinarios vol. 4. N0 3*.
- Fonda D, Gualtieri M, Scanziani E. 1989. Gastric carcinoma in the dog: A clinicopathological study of 11 cases. *Journal of Small Animal Practice*. 30: 353-360.
- Frantz A.M, Sarver A.L, Ito D, Phang T.L, Karimpour-Fard A, Scott M.C, Valli VEO, Linbland-Toh K, Burgess K.E, Husbands B.D, Henson M.S, Borgatti A, Kisseberth W.C, Hunter L.E, Breen M, O'Brien T.D, Modiano J.F. 2012. Molecular Profiling Reveals Prognostically Significant Subtypes of Canine Lymphoma. *Veterinary Pathology* 50:693-703.
- Fry M.M, Vernau W, Pesavento P.A, Bromel C, Moore P.F. 2003. Hepatosplenic Lymphoma in a Dog. *Veterinary Pathology*. 40: 556–562.

- Gavazza A, Rossi G, Lubas G, Cerquetella M, Minamoto Y, Suchodolski JS. 2017. Faecal microbiota in dogs with multicentric lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*. 16(1). p. E169-E175.
- Gentilini F, Calzolari C, Turba ME, Bettini G, Famigli-Bergamini P. 2009. GeneScanning análisis of Ig/TCR gene rearrangements to detect clonality in canine lymphomas. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 127: 47-56.
- Gross T, Ihrke PJ, Walder EJ, et al. 2005. Lymphocytic neoplasms. In Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, et al.: *Skin diseases of the dog and cat*, ed 2, Oxford. Blackwell, pp 866–893.
- Guillermo C. Couto, Carolien H. Rutgers, Robert G. Sherding, Jennifer Rojko. 1989. Gastrointestinal Lymphoma in 20 Dogs. A retrospective study. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 3 (2). 73-78.
- Head KW, Cullen JM, Dubielzig RR, Else RW, Misdorp W, Patnaik AK, Tateyama S, Van der Gaag I. 2003. Histological classification of tumors of the alimentary system of domestic animals. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, DC.
- Hughes KL, Labadie JD, Yoshimoto JA, Dossey JJ, Burnett RC, Avery AC. .Increased frequency of CD45 negative T cells (T zone cells) in older Golden retriever dogs, 2018. *Veterinary and Comparative Oncology* 16: E109–E116.
- Ian R. Tizard. 2009. *Introducción a la inmunología Veterinaria*. Octava edición.
- Ingegerd Elvers, Jason Turner-Maier, Ross Swofford, Michele Koltoonian, Jeremy Johnson, Chip Stewart, Cheng-Zhong Zhang, Steven E. Schumacher, Rameen Beroukhim, Mara Rosenberg, Rachael Thomas, Evan Mauceli, Gad Getz, Federica Di Palma, Jaime F. Modiano, Matthew Breen, Kerstin Lindbland-Toh, Jessica Alfoldi. 2015. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Research* 25:1634-1645.

- J. Armando Villamil, Carolyn J. Henry, Allen W. Hahn, Jeffrey N. Byan, Jeff W. Tyler, Charles W. Caldwell. 2009. Hormonal and Sex Impact on the Epidemiology of Canine Lymphoma. *Journal of Cancer Epidemiology*. 27: 1-7
- Jacques Fontaine, Marianne Heimann, Michael J. Day. 2010. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell Lymphoma: A review of 30 cases. *Veterinary Dermatology*. 21 (3). 267-275.
- Jacques Fontaine, Marianne Heimann, Michael J. Día. 2010. Canine cutaneous epitheliotropic T-cell lymphoma: a review of 30 cases, *Vetereinary Dermatology* 21: 267– 275.
- James F. Zachary, M. Donald McGavin. 2013. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. Ebook. Fifth edition Elsevier Health Sciences.
- James M. Dobson, B. Duncan X. Lascelles (2014). *Manual de oncología en pequeños animales*. Tercera edición, pp. 420. Ediciones S. Everitt, B.S. (1992) : *The Analysis of Contingency Tables*. Second Edition. Chapman & Hall, London, New York, Melbourne, Madras, VIII, 164 pp.
- Janeway, C.A, Travers, P. Walport, M, Schlomchick M. 2003. *Immunobiology* 5^a Ed. Ed. Churchill Livingstone.
- Kaiser H. 1981. Animal neoplasia: a systemic review. In Kaiser H, editor: *neoplasms-comparative pathology in animals, plants and man*, Baltimore. Wiliams & Wilkins.
- Keller SM, Vernau W, Hodges J, Kass PH, Vilches-Moure Jg, McElliot V, Moore PF. 2012. Hepatosplenic and Hepatocytotropic T-cell Lymphoma: Two Distinct Types of T-cell Lymphoma in dogs. *Veterinary Pathology*. 50: 281–290.
- Keller SM, VERNau W, Moore P.F. 2016. Clonality Testing in Veterinary Medicine: A review with diagnostic guidelines. *Veterinary Pathology*, 53: 711-725.
- Kenjiro Fukushima, Koichi Ohno, Yuko Koshino-Goto, Kazayuki Uchida, Kohji Nomura, Masashi Takahashi, Ko Nakashima, Yasuhito Funjino, Hajime Tsujimoto. 2009. Sensitivity for the DEtection of a Clonally Rearranged Antigen Receptor Gene in Endoscopically Obtained Biopsy Specimens from Canine Alimentary Lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*. 71(12). 1673-1676.

- Kiupel M, Smedley R.C, Pfent C, Xie Y, Xue Y, Wise A.G, DeVaul J.M, Maes R.K. 2011. Diagnostic Algorithm to Differentiate Lymphoma From Inflammation on Feline Small Intestinal Biopsy Samples. *Veterinary Pathology*. 48: 212-222.
- Krohne SDGVW, Richardson RC, et al. 1987. Ocular involvement in canine lymphosarcoma: a retrospective study of 94 cases, *Am College Vet Ophth Proc* 68–84.
- Ku CK, Kass PH, Christopher MM. 2017. Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases. *Veterinary and Comparative Oncology* 15: 1206–1217.
- Lennert KFA. 1990. Histopathology of non-hodgkin's lymphomas (based on the updated kiel classification), ed 2, Berlin, Springer-Verlag.
- MacEwen EG, Hurvitz AI. 1977. Diagnosis and management of monoclonal gammopathies, *Vet Clin North Am* 7: 119–132.
- Madewell B. 1987. Hematopoietic neoplasms, sarcomas and related conditions. In Theilen GH, Madewell B, editors: *Veterinary Cancer Medicine*, ed 2, Philadelphia, Lea and Febiger.
- Madewell BR, Feldman BF. 1980. Characterization of anemias associated with neoplasia in small animals, *J Am Vet Med Assoc* 176: 419–425.
- Manikhandan AV, Ross D. Haggart, Gino Miele, Grant Sellar, Karen AL, John R. Goodlad, Elspeth Milne, David M. Vail, Llenn Kurzman, Daniel Crowther, David J. Argly. 2013. Comparative Gene Expression Profiling Identifies Common Molecular Signatures of NF-kB Activation in Canine and Human Diffuse Large B cell Lymphoma (DLBCL). *Plos One* 8:e72591.
- Masamine Takanosu, Yumiko Kagawa. 2015. Comparison of primer sets for T-cell clonality testing in canine intestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Diagnostic investigation*. 27: 645- 650.
- McDonough S.P, Van Winkle T.J, Valentine B.A, Van Gessel Y.A, Summers B.A. 2002. Clinicopathological and immunophenotypical features of canine intravascular

- lymphoma (malignant angioendotheliomatosis). *Journal of Comparative Pathology*. 126: 277–288.
- Milman G, Smith KC, Erles K. 2011. Serological detection of EpsteinBarr virus infection in dogs and cats. *Veterinary Microbiology*. 150: 15-20.
- Modiano JF, Breen M, Robert C, Parker HG, Inusah S, Thomas R, Avery PR, Lindblad-Toh K, Ostrander E, Cutter GC, Avery AC. 2005. Distinct B-Cell and T-Cell Lymphoproliferative Disease Prevalence among Dog Breeds Indicates Heritable Risk. *Cancer Research* 65: (13). 5654-61
- Moore A. S. 2007. What is the best protocol for canine lymphoma?. *Proceedings of the World Small Animal Veterinary Association Sydney, Australia*.
- Moore P.F, Olivry T, Naydan D. 1994. Canine cutaneous ephiteliotropic lymphoma (mycosis fungoides) is a proliferative disorder of CD8+ T Cells. *The American Journal of Pathology. Cellular and molecular biology of disease*. 144 (2): 421-429.
- Murphy Kenneeth, Travers Paul, and Walport Mark. (2009) *Janeway's Immunobiology* (7th Ed.) McGraw-Hill Interamericana Editores, SA de CV: 111-217
- Naoki Kaneko, Yoshifumi Yamamoto, Yuko Wada, Takako Shimokawa Miyama, Hiroko Hiraoka, Kazuhito Itamoto, Takuya Mizuno, Munekazu Nakaichi, Tomoko Takahashi, Toshihiro Watari, Masaru Okuda. 2009. Application of polymerase chain reaction to análisis of antigen receptor rearrangements to support endoscopic diagnosis of canine alimentary lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science*. 71(5): 555-559.
- Nasir L, Argyle DJ. 1999. Mutational Analysis of the tumos suppressor gene p53 in lymphosarcoma in two bull mastiffs. *The Veterinary Record*. 145(1): 23-24.
- National Cancer Institute sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: summary and description of a working formulation for clinical usage. 1982. *The Non-Hodgkin's Lymphoma Pathologic Classification Project*, *Cancer* 49: 2112–2135.

- Nik Veldhoen, Jane Stewart, Robert Brown, Jo Milner. 1998. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene*. 16: 249255.
- Noriko Tonomura, Ingegerd Elvers, Rachael Thomas, Kate Megquier, Jason Turner-Maier, Cedric Howald, Aaron L. Sarver, Ross Swofford, Aric M. Frantz, Daisuke Ito, Evan Mauceli, Maja Arendt, Hyun Ji Noh, Michele Koltookian, Tara Biagi, Sarah Fryc, Christina Williams, Anne C. Avery, Jong-Hyuk Kim, Lisa Barber, Kristine Burgess, Eric S. Lander, Elinor K. Karlsson, Chieko Azuma, Jaime F. Modiano, Matthew Breen, Kerstin Lindbland-Toh. 2015. Genome-wide Association Study Identifies Shared Risk Loci Common to Two Malignancies in Golden Retrievers. *Plos Genetics*. 11 (2): e 1005339.
- Olivero D, Turba ME, Gentilini F. 2011. Reduced diversity of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in chronic inflammatory gastrointestinal diseases in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 144, 337-345.
- Ozaki K, Yamagami T, Nomura K, Narama I. 2006. T-cell Lymphoma with Eosinophilic infiltration involving the intestinal tract in 11 dogs. *Veterinary Pathology*. 43: 339-344.
- Patnaik AK, Hurvitz AI, Johnson GF. 1977. Canine gastrointestinal neoplasms. *Vet Pathol* 14: 547-555.
- Paul G. Greenlee, Daniel A. Filippa, Fred W. Quimby, Amiya K. Patnaik, Steven E. Calvano, Robert E. Matus, Marek Kimmel, Arthur I. Hurvitz, Philip H. Lieberman. 1990. Lymphomas in dogs. A morphologic, immunologic, and clinical study, *Cancer* 66: 480– 490.
- Peter F. Moore, Jennifer C. Woo, William Vernau, Sandra Kosten, Petra S. Graham. 2005. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable región genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106(3-4): 167-178.
- Peter F. Moore, Verena K. Affolter, Petra S. Graham, Barbara Hirt. 2009. Canine epitheliotropic cutaneous T-cell Lymphoma: An investigation of T-cell receptor

- immunophenotype, lesión topography and molecular clonality. *Veterinary Dermatology*. 20, 5-6: 569-576.
- Pinello K.C., Santos M, Leite-Martins L, Niza-Ribeiro J, A.J. de Matos. 2017. Immunocytochemical study of canine lymphomas and its correlation with exposure to tobacco smoke. *Veterinary World*. 11: 1207-1313.
- Poche Ceballos, Alba Mirian, Agudelo Puyo, Ana María, Sánchez Arévalo, Diana Cristina, Valencia Hernández, Andrés Felipe. 2017. Aproximación diagnóstica a un linfoma multicéntrico en caninos: de lo clínico a lo histopatológico. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*. Volumen 18. 11: 1-18.
- Poggi A, Miniscalco B, Morello E, Gattino F, Delaude A, Ferrero Poschetto L, Aresu L, Gelain ME, Martini V, Comazzi S, Riondato F. 2016. Prognostic significance of ki67 evaluated by Flow cytometry in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary and comparative oncology*. 15(2): 431-440.
- Pohlman LM, Higginbotham ML, Welles EG, Johnson CM. 2009. Immunophenotypic and Histologic Classification of 50 cases of Feline Gastrointestinal Lymphoma. *Veterinary Pathology*, 46: 259-268.
- Ponce F, Marchal T, Magnol JP, Turinelli V, Ledieu D, Bonnefont C, Pastor M, Delignette ML, Fournel-Fleury C. 2010. A morphological study of 608 cases of canine malignant lymphoma in France with a focus on comparative similarities between canine and human lymphoma morphology, *Veterinary Pathology*. 47: 414–433.
- Priester WA, McKay FW. 1970. The occurrence of tumors in domestic animals, *Natl Cancer Inst Monogr* 1–210.
- Raulet David H. 1989 La estructura, función y genética molecular del receptor de células T gamma / delta. *Annual Reviews Inc.*, 7: 175-207
- Rezuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. 1997 Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem*. 43(10): 1814–23

- Robin Miley Cobb, Kenneth J. Oestreich, Oleg A. Osipovich, Eugene M. Oltz. 2006. Accessibility control of V(D)J recombination. *Advances in Immunology*, 91: 45-109.
- Rojas, W., Cabrera, J. M. A., Aristizabal, B., Luz Elena Cano R, Luis Miguel Gómez O, & Lopera, D. (2012). *Inmunología de rojas*. Corporacion para Investigaciones Biologicas (CIB).160-192.
- Rosol TJ, Capen CC. 1992.Mechanisms of cancer-induced hipercalcemia. *Laboratory Investigation: Journal of Technical Methods and Pathology* 67: 680–702.
- Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders. In *Vivo* (Athens, Greece). 11(2): 169-172.
- Ruslander DA, Gebhard DH, Tompkins MB, Grindem CB, Page RL. 1997. Immunophenotypic characterization of canine lymphoproliferative disorders, In *Vivo* (Athens, Greece) 11(2): 169–172.
- Santoro D, Marsella R, Hernández J. 2007. Investigation on the association between atopic dermatitis and the development of mycosis fungoides in dogs: a retrospective case-control study. *Veterinary Dermatology*. 18 (2): 101-106.
- Scanziana E, Giusti AM, Gualtieri M, Fonda D. 1991. Gastric carcinoma in the Belgian Sheperd dog. *Journal of Small Animal Practice*. 32: 465-469.
- Siso S, Marco-Salazar P, Moore PF, Sturges BK, Vernau W, Wisner ER, Bollen AW, Dickinson PJ, Higgins RJ. 2017. Canine nervous system lymphoma subtypes display characteristic neuroanatomical patterns, *Veterinary Pathology* 54: 53–60.
- Sullivan M, Lee R, Fisher EW, Nash AS, McCandlish IA. 1987. A study of 31 cases of gastric carcinoma in dogs. *The Veterinary Record*. 120 (4): 79-83.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. 2008. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. WHO Press. Geneva, Switzerland. Fourth Edition, France. Vol 2

- Takanosu M, Tadika T, Kobayashi T. 2010. Heteroduplex polymerase chain reaction is essential for canine receptor rearrangement analysis. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 760-763.
- Tamura K, Yagihara H, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. 2006. Development of the polymerase chain reaction assay based on the canine genome database for detection of monoclonality in B cell lymphoma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 110: 163-167.
- Thales A.F. Albuquerque, Luisa Drummond do Val, Aoife Doherty, João Pedro de Magalhães. 2018. From humans to hydra: Patterns of cancer across the tree of life. *Biological Reviews*. Cambridge Philosophical Society. 93: 1715–1734.
- Tom Anderson, Bruce A. Chabner, Robert C. Young, Costan W. Berard, AJ Garvin, Richard M. Simon, Vincent T. Devita. 1982. Malignant lymphoma. 1. The histology and staging of 473 patients at the National Cancer Institute. *Cancer* 50(12): 2699-2707.
- Twedt DC 1992: Vomiting. In: Anderson NV, Sherding RG, Merritt AM, Whitlock RH (eds.): *Veterinary gastroenterology*. Lea & Febiger, London, pp. 359-361
- Vail D, Thamm DH. 2007. Tumores hematopoyéticos. En Ettinger & Feldman (Ed), *Tratado de Medicina interna veterinaria*, 6ªed. Madrid, España: Elsevier Saunders, pp. 732-747.
- Vail DM, Kisseberth WC, Obradovich JE, Moore FM, London CA, MacEwen EG, Ritter MA. 1996. Assessment of potential doubling time (Tpot), argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNOR), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as predictors of therapy response in canine non-Hodgkin's lymphoma, *Exp Hematol* 24: 807–815.
- Villamizar-Rivera N, Olaya N. 2015 Estudio de la clonalidad linfóide por medio del análisis de reordenamientos del receptor de antígeno. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*;53(1):56-65.

- Valli VE, Kass PH, San Myint M, Scott F. 2013. Canine lymphomas: association of classification type, disease stage, tumor subtype, mitotic rate, and treatment with survival, *Veterinary Pathology*. 50: 738–748.
- Valli VE, San Myint M, Barthel A, Bienzle D, Caswell J, Colbatzky F, Durham A, Ehrhart EJ, Johnson Y, Jones C, Kiupel M, Labelle P, Lester S, Miller M, Moore P, Moroff S, Roccabianca P, Ramos-Vara J, Ross A, Scase T, Tvedten H, Vernau W. 2011. Classification of canine malignant lymphomas according to the World Health Organization criteria, *Veterinary Pathology*. 48: 198–211.
- Valli VE, Vernau W, de Lorimier LP, Graham PS, Moore PF. 2006. Canine indolent nodular lymphoma, *Veterinary Pathology* 43: 241–256.
- Waly N.E, Gruffyd-Jones T.J, Stokes C.R, Day M.J. 2005. Immunohistochemical Diagnosis of Alimentary Lymphomas and Severe Intestinal inflammation in Cats. *Journal Comparative Pathology*, 133(4): 253-260.
- Washabau RJ, Día MJ, Willard MD, Hall EJ, Jergens AE, Mansell J, Minami T, Bilzer TW. 2010. Endoscopic, Biopsy, and Histopathologic Guidelines for the Evaluation of Gastrointestinal Inflammation in Companion Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(1): 10-26.
- Wilkerson M.J, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garret L, Barber L, Avery A. 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expresión of CD molecules. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 106(3-4): 179-196.
- Wilkerson MJ, Dolce K, Koopman T, Shuman W, Chun R, Garrett L, Barber L, Avery A. 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukemias and aberrant expression of CD molecules, *Veterinary Immunology and Immunopathology* 106: 179–196.
- Yagihara H, Tamura K, Isotani M, Ono K, Washizu T, Bonkobara M. 2007. Genomic organization of the T-cell receptor gamma gene and PCR detection of its clonal rearrangement in canine T-cell lymphoma/leukemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 115: 375-382.

Anexo 1

Tabla 3. Cuantificación de ácidos nucleicos de tejidos incluidos en muestras de parafina y formalina

<i>Muestras</i>	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μl
<i>M1</i>	0.445	0.231	0.038	0.397	0.19	2.095	397.355
<i>M2</i>	0.545	0.283	0.049	0.48	0.229	2.097	479.569
<i>M3</i>	0.377	0.197	0.037	0.33	0.157	2.105	330.416
<i>M4</i>	0.456	0.242	0.04	0.401	0.196	2.045	401.114
<i>M5</i>	0.128	0.082	0.039	0.081	0.041	1.965	80.569
<i>M6</i>	0.153	0.093	0.038	0.105	0.053	2.003	105.355
<i>M7</i>	0.121	0.081	0.046	0.067	0.033	2.02	66.537
<i>M8</i>	0.109	0.072	0.04	0.059	0.029	2.005	58.803
<i>M9</i>	0.14	0.087	0.038	0.093	0.046	2.014	93.057
<i>M10</i>	0.146	0.089	0.039	0.098	0.048	2.051	97.705
<i>M11</i>	0.157	0.096	0.043	0.105	0.05	2.087	104.629
<i>M12</i>	0.115	0.073	0.037	0.068	0.033	2.083	68.267
<i>M13</i>	0.215	0.126	0.048	0.158	0.075	2.098	157.682
<i>M14</i>	0.15	0.093	0.043	0.097	0.047	2.067	97.28
<i>M15</i>	0.199	0.113	0.038	0.152	0.073	2.092	151.889
<i>M16</i>	0.348	0.185	0.039	0.298	0.143	2.091	298.199
<i>M17</i>	0.439	0.229	0.043	0.387	0.184	2.107	386.863
<i>M18</i>	0.389	0.205	0.042	0.334	0.16	2.095	334.373
<i>M19</i>	0.181	0.104	0.038	0.134	0.064	2.088	133.737
<i>M20</i>	0.437	0.228	0.04	0.385	0.185	2.086	385.23
<i>M21</i>	0.076	0.057	0.039	0.032	0.014	2.214	31.883
<i>M22</i>	0.158	0.137	0.098	0.056	0.037	1.509	55.711
<i>M23</i>	0.207	0.157	0.119	0.083	0.035	2.379	83.184
<i>M24</i>	0.119	0.084	0.052	0.063	0.029	2.183	63.075
<i>M25</i>	0.099	0.068	0.038	0.056	0.026	2.117	55.611
<i>M26</i>	0.125	0.084	0.048	0.072	0.033	2.187	72.328
<i>M27</i>	0.102	0.07	0.038	0.059	0.029	2.066	59.309
<i>M28</i>	0.138	0.099	0.059	0.074	0.037	2.019	74.485
<i>M29</i>	0.125	0.079	0.041	0.074	0.034	2.153	73.678
<i>M30</i>	0.145	0.113	0.09	0.045	0.019	2.326	45.063
<i>M31</i>	0.218	0.124	0.042	0.166	0.078	2.123	165.673
<i>M32</i>	0.236	0.136	0.051	0.176	0.082	2.15	175.835

M33	0.336	0.185	0.046	0.28	0.135	2.069	279.737
M34	0.311	0.172	0.043	0.258	0.125	2.065	257.697
M35	0.169	0.1	0.04	0.119	0.056	2.106	118.882
M36	0.762	0.387	0.042	0.71	0.341	2.081	709.89

Las muestras M1 a M20 corresponden a las muestras de pacientes incluidas en cubos de parafina. A partir de la muestra M21a M36 son las muestras correspondientes a tejidos incluidos en formalina.

Tabla 4. Cuantificación de ácidos nucleicos de muestras sanguíneas.

Muestras	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μl
M1	0.051	0.046	0.04	0.006	0.003	1.875	5.915
M2	0.063	0.056	0.05	0.009	0.004	2.389	8.583
M3	0.062	0.058	0.05	0.007	0.004	1.578	6.991
M4	0.047	0.043	0.039	0.004	0.001	2.857	4.001
M5	0.102	0.073	0.04	0.056	0.029	1.923	56.267
M6	0.149	0.101	0.052	0.093	0.046	2.015	92.807
M7	0.064	0.052	0.039	0.021	0.011	1.963	21.192
M8	0.071	0.055	0.038	0.029	0.014	2.007	28.74
M9	0.07	0.059	0.046	0.02	0.011	1.861	19.964
M10	0.08	0.074	0.063	0.013	0.008	1.61	13.203
M11	0.062	0.057	0.05	0.007	0.004	1.921	7.272
M12	0.047	0.043	0.039	0.004	0.001	3	3.599
M13	0.069	0.062	0.054	0.011	0.005	2.229	10.645
M14	0.06	0.051	0.04	0.016	0.008	1.963	16.084
M15	0.051	0.047	0.042	0.004	0.002	2.045	4.47
M16	0.077	0.069	0.061	0.012	0.005	2.38	11.898

Anexo 2

A. Definición de unidad

Una unidad de ADN polimerasa es la cantidad de enzima necesaria para catalizar la incorporación de 10 nanomoles de nucleósidos en un producto adsorbible DE81 en 30 min a 74 ° C en condiciones de ensayo.

B. Ausencia de contaminación

El ADN polimerasa Taq utilizada es una enzima recombinante altamente purificada, libre de cualquier nickasa, endonucleasa, exonucleasa 3' y ribonucleasa.

Se comprueba que todos los demás componentes utilizados en la mezcla maestra de Taq- & GO (5XC) estén libres de endo o exonucleasa.

C. Ejemplo de ensayo de PCR en molde genómico humano

Esta prueba se lleva a cabo como control de calidad para cada lote de mezcla maestra Taq- & GO y los resultados se comparan con el método tradicional utilizando componentes separados.

Se amplificó una región de 400 pb del gen de la B-globina humana utilizando cebadores específicos. Los ensayos de PCR con cantidades decrecientes de plantilla de ADN se compararon utilizando Taq- & GO 5xc o el componente separado (método tradicional). A continuación, los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa.

Condiciones de ensayo	Método tradicional
Taq- & GO	Volumen de reacción: 50 µl
Volumen de reacción: 50µl	Tampón de incubación T.Pol (10xC) con MgCl ₂ : 5µl
Plantilla de ADN: 100 pg a 100 ng	Plantilla de ADN: 100 pg a 100 ng
Primers específicos: 50 pmoles cada una	Primers específicos: 50 pmoles cada uno

	dNTP: 10 nmoles cada uno (200 μ M final) Pol de ADN Taq: 1.5 U
--	--

Resultados

En todos los ensayos se obtienen productos de PCR específicos de 400 pb de longitud. Taq- & GO es tan eficaz como el método tradicional independientemente de la cantidad de plantilla de ADN utilizada.

D. Prueba de PCR repetitiva

Los ensayos de PCR repetitivos que utilizan Taq- & GO (5xC) se realizaron regularmente (como se describió anteriormente) con varias cantidades de plantilla de ADN (globina B humana) para controlar la reproducibilidad precisa de la eficiencia de la PCR

E. Cantidad y origen de la plantilla de ADN.

El molde de ADN puede ser plásmido, fágico o genómico (ADN total extraído de las células), pero también en un ADNc obtenido de un ARNm por transcripción inversa. Un alto nivel de secuencias de ADN a amplificar, ya que los primers determinan la especificidad de la amplificación.

La cantidad elegida depende del tamaño del fragmento de PCR y su origen.

-Por ejemplo, ADN genómico humano que amplifica 420 pb en un gen de B-globina de 71,5 kb (longitud total):

-1 pg a 200 ng de molde = 6 fg a 1 ng de ADN amplificable real.

-p.ej. ADN del fago lambda que amplifica 3,8 kb a partir de 48,5 kb: plantilla de 10 ng = 800 pg de ADN amplificable real.

Cuando se parte de una cantidad baja de ADN, la reacción permanece en la fase exponencial de duplicación (105 moléculas en la estrella generan 1012 moléculas después de 28 a 30 ciclos). Cuanto mayor sea el tamaño del fragmento a amplificar o cuanto mayor sea la cantidad de plantilla, antes se saturará la reacción en términos de duplicación.

F. Condiciones de reacción

La mezcla maestra Taq- & GO (5xC) está optimizada para una PCR estándar eficiente y reproducible. No obstante, cada tipo de amplificación necesita una optimización individual y depende del tipo de molde, las secuencias complementarias de los primers y la longitud del producto amplificado. La siguiente información se proporciona como consejo general.

G. Componentes de PCR.

Todos los reactivos se añaden en condiciones estériles, en un microtubo de PCR, preferentemente en hielo.

Volumen de reacción 50 µl

Taq- & GO (5XC) Mastermix 10 µl

Plantilla de ADN de 100 pg a 100 ng (según su origen)

Cada Primer de 10 a 50 pmoles

Los ensayos de PCR se pueden realizar en un volumen de 20 µl, usando 4 µl Taq- & GO.

H. Directrices para el diseño de secuencias de primers.

-La longitud de un primer depende de su contenido (A + T) y de la Tm de su par.

-La probabilidad de apareamiento con secuencias distintas del objetivo elegido tiene que ser muy baja

-Si "x" es el número de bases de un primer, 4x (4 = los cuatro nucleótidos) es el tamaño del molde donde la secuencia del primer estará estadísticamente presente solo una vez. El tamaño del genoma humano es de aproximadamente 3×10^9 pb, por lo que el tamaño del primer (x) debe ser superior a 15 bases (superior a 20 bases para plantas).

-Los primers deben tener al menos una secuencia complementaria mínima de 16 nucleótidos a la plantilla, para la amplificación en ADN genómico de humanos y animales y plantas de abeto de 21-22 nucleótidos. Esa longitud no debe exceder las 28-30 bases.

-La adición de varias bases no emparejadas (para introducir un sitio de restricción) podría ocurrir en el extremo 5' del primer.

-Una única base no emparejada (introducción de una mutación puntual) puede ubicarse dentro o en cualquier extremo de la secuencia del primer.

-La adición de más de una base no emparejada en el extremo 3' del primer complementario provocará un efecto de "respiración" que evita la amplificación.

-La composición final de la base siempre debe ser del 50-60% (G + C).

-La T_m (temperatura de fusión) de ambos imprimadores debe ser equivalente y no exceder los 70°C (4°C por G / C + 2°C por A / T).

-La temperatura de alineación depende directamente de la longitud y composición de los primers. Uno debe apuntar a usar una temperatura de hibridación (T_a) de aproximadamente 5°C por debajo de la T_m más baja del par de primers que se van a usar.

H. Directrices para el diseño de secuencias de primers (Continuación).

-Los extremos 3' de los primers no deben ser complementarios para evitar dímeros de primers.

-Debe evitarse la posibilidad de formar estructuras secundarias como peluquines. Si se requiere una posición particular en el primer, pero da como resultado una estructura secundaria, intente mover el primer ligeramente en la dirección 5' o 3' en la plantilla de ADN complementario, hasta que se eviten las horquillas, o al menos se reduzca su T_m .

-Los primers con estructuras secundarias se pueden acortar en sus extremos de 5' o 3' para hacer que la horquilla sea inestable.

-En todos los casos, cuando no se puede evitar la horquilla, la T_m de la horquilla debe ser significativamente más baja que la temperatura de la alineación final para permitir la desnaturalización de la estructura secundaria durante el proceso de PCR.

I. Programa PCR

1. Se recomienda un paso de desnaturalización inicial de 5 minutos a 93-95° C (no más de 95 ° C) para asegurar la separación completa de las dos cadenas de ADN.
2. Para los ciclos posteriores, un tiempo de desnaturalización de 30-60 segundos a 93-95° C es suficiente para fragmentos de PCR <3-4 kb.
3. Para fragmentos de PCR más largos de 4 kb (4 a 8 kb): como las altas temperaturas (como 95° C) disminuyen el pH de la reacción y, por lo tanto, favorecen la depurinación, el tiempo de desnaturalización debe reducirse a 20 segundos para asegurar la amplificación.
4. La temperatura de hibridación depende directamente de las secuencias del primer y la cantidad de homología de secuencia con el molde. Una fórmula simple para calcular la T_m es 4° C por G / C y 2° C por A / T y colocar la temperatura de alineación 5° C por debajo.
5. Una consecuencia de una T_a demasiado baja es un rendimiento reducido del producto deseado y la aparición de amplicones no específicos. Uno o ambos primers se aparearán con secuencias distintas de la diana verdadera, ya que se pueden tolerar los desajustes internos de una sola base.
6. Una consecuencia de una T_a demasiado alto es un menor rendimiento de producto, ya que se reduce la probabilidad de hibridación del cebador y es posible que la plantilla inicial no permanezca desnaturalizada.
- *7. Para los primers alargados con bases no emparejadas o que contienen mutaciones puntuales, defina la temperatura de hibridación de la secuencia complementaria a la plantilla original y utilícela para los primeros 3 a 5 ciclos de PCR. Para definir la temperatura de hibridación de los últimos 20 o 30 ciclos, considere la secuencia total de los cebadores que se hibridarán con los fragmentos recién amplificados.
8. La mayoría de los primers se hibridan eficazmente en 30 a 60 segundos o menos, a menos que T_a esté demasiado cerca de T_m , o los primers sean inusualmente largos.

I. Programa PCR (Continuación)

9. Para el paso de enlongación a 72° C, 1 min por 1 kb es suficiente cuando el ADN amplificable es superior a 2 kb. Por debajo de 2 kb, esta regla no se cumple. Consulte la guía del usuario de su termociclador, ya que el tiempo necesario para una longitud específica puede cambiar con la máquina.

10. El número de ciclos depende de la concentración inicial del ADN diana. Se recomiendan entre 20 y 37 ciclos. Por encima de 37 ciclos, pueden ocurrir problemas de especificidad debido al agotamiento de los componentes de la PCR. Luego, la reacción de PCR se somete a una atenuación en la tasa exponencial de acumulación de producto en las últimas etapas de una PCR.

11. Al final del programa de PCR, puede ser conveniente realizar una extensión final de hasta 10 minutos a 72° C. Esto reduce el número de fragmentos amplificados de forma incompleta.

J. Solución de problemas

1. Se observó poca o ninguna amplificación.

-Compruebe la T_m de los primers y sus secuencias homólogas a la plantilla.

-Verificar la secuencia de los primers y la ausencia de estructuras secundarias, como los dímeros de primers o las horquillas.

-Reducir la temperatura de alineación de 2° C a 5° C.

-Si la temperatura de alineación (T_a) está cerca de la temperatura de enlongación, realice la PCR disminuyendo " T_a " en cada ciclo.

-Elevar la temperatura de desnaturalización inicial o aumentar su tiempo.

-Incrementar el tiempo de enlongación.

-Aumente el número de ciclos en 5 (si <35).

-Varíe la cantidad de plantilla y / o primers.

-Considere la presencia de factores inhibidores (por ejemplo, NaCl, Mn^{2+} , SDS) introducidos con la plantilla de ADN.

J. Solución de problemas (Continuación).

2. Se observan múltiples bandas o manchas

-Compruebe la T_m de los primers y sus secuencias homólogas a la plantilla.

-Verificar las secuencias de los primers y la ausencia de estructuras secundarias.

-Aumente la temperatura de hibridación de los primers de 2° C a 5° C para evitar una hibridación inespecífica.

-Para primers alargados con bases no emparejadas o que contienen mutaciones puntuales, compruebe que la temperatura de hibridación elegida esté adaptada.

-Alargue la secuencia homóloga del primer al molde.

*-Cuando se agregan bases mal emparejadas, aumente la temperatura de hibridación de las secuencias homólogas de los primers en 2° C para evitar la hibridación inespecífica de las secuencias no homólogas de los primers. Y / o aumentar la temperatura de alineación de los primers en 2° C durante los últimos 20-30 ciclos.